

Aus dem Anatomischen Institut der Freien Universität Berlin

Direktor: Professor Dr. Wüstenfeld

Arbeitsgruppe Professor Dr. med. H.J. Merker

**DIE ENTWICKLUNG KOLLAGENER TEXTURMUSTER
IM CORIUM DER EMBRYONALEN UND GEBORENEN MAUS**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Klaus-Jürgen Taube

aus Berlin

1976

Aus dem Anatomischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. Wüstenfeld
Arbeitsgruppe Prof. Dr. med. H.J.Merker

DIE ENTWICKLUNG KOLLAGENER TEXTURMUSTER IM CORIUM DER
EMBRYONALEN UND GEBORENEN MAUS



INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

an den

Medizinischen Fachbereichen der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Klaus - Jürgen Taube

aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. H.-J. Merker

Korreferent: Prof. Dr. med. W. Schwarz



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am 5. Februar 1976

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
I Mesenchym	
II Proteoglykane	
III Kollagen	
IV Kollagen u. Proteoglykane	
Material und Methode	10
Befunde	11
Diskussion	19
Zusammenfassung	28
Literaturverzeichnis	29
Abbildungen	
Lebenslauf	

Einleitung

Der mesenchymale Anteil der Haut besteht aus Zellen und Interzellularsubstanz, die kollagene und elastische Fasern enthält. Die Interzellularsubstanz wird von den ortsständigen Bindegewebszellen synthetisiert. Bei der Aufklärung der Morphologie und Biosynthese der Interzellularsubstanz, besonders der kollagenen Fibrillen, wurde häufig mit Zell- und Gewebekulturen gearbeitet. Diese Systeme eignen sich gut, da man mit ihnen replizierte Zelllinien unter konstanten Bedingungen zum Vergleich chemischer und ultrastruktureller Meßgrößen innerhalb einer bestimmten Wachstumsphase heranziehen kann. (BORNSTEIN et al., 1972; GOLDBERG und GREEN, 1964; LAYMAN und ROSS, 1973; PRIEST, 1972; SCHWARZ et al., 1962; VUUST und PIETZ, 1970) Die genannten Autoren haben im Wesentlichen dazu beitragen können, den intrazellulären Ablauf der Kollagensynthese bis zur Sekretion kollagener Vorstufen und zur Fibrillenbildung aufzuklären. Es ist aber noch wenig bekannt über die Bildung noch höherer Strukturen, der kollagenen Fasern, denn die Fibrillogenese ist mit dem Auftreten einer typisch quergestreiften Fibrille noch nicht abgeschlossen: Es folgen das für jedes Organ, Alter und für jede Spezies charakteristische Dickenwachstum der Fibrillen (SCHWARZ, 1964), die Bündelung der Fibrillen zur Faser und schließlich die räumliche Anordnung der Fasern zur ortstypischen Textur. Faserbündelung und Texturentstehung sind aber nur im ursprünglichen Gewebepreparat zu verfolgen, denn die makromolekulare Organisation von Kollagen ist darauf ausgerichtet, der mechanischen Funktion des entsprechenden Bindegewebes zu genügen. So enthalten Bänder und Sehnen dichtgepackte, streng parallel zur Zugspannung orientierte Faserbündel mit großer mechanischer Stabilität. Die Haut dagegen wird von einem Netzwerk kreuz und quer verlaufender Fasern gebildet, die scheinbar zufällig verlaufen und erst unter Zug eine einheitliche Verlaufsrichtung nehmen (GIBSON et al., 1965). Diese Anordnung macht die Dehnbarkeit und Elastizität der Haut aus.

Da über die Faserbildung und Ausprägung der Textur noch wenig bekannt ist, soll hier mit licht- und elektronenmikroskopischen Methoden versucht werden, einen Beitrag zur Morphogenese kollagener Texturmuster

im Corium der embryonalen und geborenen Maus zu liefern. Zum besseren Verständnis des Problems sollen die einzelnen Bestandteile des Mesenchym zunächst gesondert dargestellt werden, um daran die Probleme genauer zu entwickeln.

I Mesenchym

Die epithelialen Anteile der Haut und ihrer Anhangsgebilde sind ektodermalen Ursprungs, der bindegewebige Teil, Corium oder Dermis, entstammt dem Mesenchym. Das Mesenchym ist die Grundform, aus der die verschiedenen Erscheinungsformen der zellulären (Fibroblast, Chondroblast, Osteoblast, glatte Muskelzelle) und fibrillären (Kollagen, Elastin, Retikulin, Proteoglykane) Bestandteile des Bindegewebes hervorgehen. Seine Zellen bilden einen weitmaschigen Verband, dessen Zwischenräume von einer Grundsubstanz angefüllt werden, die weitgehend aus Proteoglykanen und Kollagen besteht. Mit Hilfe einer bestimmten Färbemethode (Rutheniumrot, LUFT, 1971) kommen die Proteoglykane (PG) strukturiert zur Darstellung.

Es handelt sich hierbei um ein Netzwerk aus Granula und Filamenten, die im Verlauf der sehr frühen Bindegewebsentwicklung eine unterschiedliche Feinstruktur zeigen. Diese als PG identifizierten Strukturen bestehen aus einem dichten, etwa 400 - 600 Å großen Zentrum, von dem gestreckt oder geschlängelt feine Fäden bis zu 2000 Å weit radiär in die Umgebung ausstrahlen. Später, wenn auch bereits Kollagen gebildet wird, tritt ein anderer Typ von PG auf, der sich dadurch auszeichnet, daß nur wenige Fäden vom Zentralgranulum ausgehen. Der Zeitpunkt ihres Auftretens und ihre räumliche Beziehung zu anderen Bindegewebsarten sind Hinweise darauf, daß es sich um Hyaluronsäure und Chondroitinsulfat-Proteinkomplexe handeln könnte (MERKER und GÖNTHER, 1972).

Aus Untersuchungen im Interzellularraum von Hühnchenembryos geht hervor (KLÜPPEL, 1969), daß unerwartet früh, d.h. vor dem Vorhandensein eines klassischen Mesenchyms, Zellen vorhanden sein müssen, die Mesenchymfunktion im Sinne der Interzellulärsubstanzbildung übernehmen.

Es sind dies wegen ihrer ähnlichen Morphologie als "Fibroblasten-ähnliche-Zellen" beschriebene praemesodermale Mesenchymzellen (MERKER, 1975; KLÜPPEL, 1969) deren mit Ribosomen besetzte endoplasmatische Membranen für die Synthese von Kollagen und des Proteinanteils der PG verantwortlich sind. Allerdings gibt es Hinweise dafür genug, daß in diesen frühen Stadien auch epitheliale Zellen des Periderm oder der Chorda in der Lage sind, MPS Proteine und Kollagen zu synthetisieren (HAY und REVEL, 1963). Bildung und Reifung der mesenchymalen Interzellulärsubstanz beginnt mit der Synthese und Sekretion der PG, die in den weitmaschigen Räumen des Mesenchym ein dreidimensionales Netzwerk bilden und aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften eine Reihe wichtiger Funktionen ausüben: Sie kontrollieren den Flüssigkeits- und Substrathaushalt durch ihre Filterfunktion, indem sie die Permeabilitäts- und Diffusionsvorgänge im Interzellularraum (IZR) steuern. Dieser Molekularsiebeffekt (KREYSEL, 1975) ist von der Integrität der Molekularstruktur abhängig. Die wiederum steigt mit zunehmender Ladungsdichte, was z.B. bei Calcifizierungsvorgängen von Bedeutung ist, wo diese PG die Funktion von Calciumfängern einnehmen sollen. Schließlich sind die engen morphologischen und biochemischen Zusammenhänge bekannt, die zwischen PG- und Kollagenmolekülen bestehen (LOWTHER et al., 1970). Da PG auf den Aggregationsvorgang des Kollagen im IZR in bestimmter Weise Einfluß nehmen, soll kurz auf die Chemie und Biosynthese der PG eingegangen werden.

) Mukopolysaccharid-Proteine

II Proteoglykane

Die Muster der MPS-haltigen Proteinverbindungen, also wesentlich der Proteoglykane, verändern sich während Entwicklung, Reifung und Alterung und sind unterschiedlich in den einzelnen Bindegeweben (BALAZS, 1970; LINDNER, 1974; MERKER und STRUWE, 1971): Es sind Proteine, die als integrierende Bestandteile einen äquimolaren Anteil an Uronsäuren und meist sulfatierten Aminosackern, nämlich Glucosamin oder Galaktosamin, enthalten. Die Haut der Neugeborenen z.B. enthält ca 75% Hyaluronsäure und 25% Dermatan-sulfat (LINDNER, 1974). In der Haut Erwachsener ist das Verhältnis nahezu umgekehrt.

Enzyme des Hyaloplasma synthetisieren den MPS Anteil. Es konnte nun sicher nachgewiesen werden, daß der Polysaccharidanteil kovalent mit einer Proteinkette verbunden ist (GELMAN und BLACKWELL, 1974; GREILING, 1974), wobei auch hier in verschiedenen Bindegeweben unterschiedliche Bindungstypen vorkommen. Der Proteinanteil wird an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, anschließend erfolgen Polysaccharidbildung durch schrittweises Anfügen von Monosaccharideinheiten, Polymerisierung und der für die speziellen physiko-chemischen Eigenschaften der PG verantwortliche Sulfatierungsprozeß (GREILING, 1974). Wachsende MPS-Ketten sollen an die Golgimembranen fixiert sein, ehe sie schließlich mit dem Proteincore das Proteinglykan bilden. Serafini-Fracassinis Modell des Protein-Polysaccharid-Makromoleküls zeigt ein doppelstrangiges Gebilde mit identischen Seitenketten, das aus Untereinheiten von Polypeptidketten der Länge 1100 - 1500 Å mit jeweils zwei Polysaccharidseitenketten besteht. Diese Untereinheiten liegen parallel jeweils um die halbe Länge voneinander versetzt und schraubenartig vor, sodaß zunächst ein Trimer doppelter Länge aus drei Polypeptidketten und sechs Polysaccharidseitenketten entsteht, die dann durch Polymerisation ein PG Makromolekül bilden (SERAFINI-FRACASSINI und STIMSON, 1970). Diese verleihen der Grundsubstanz bestimmte physikalische Eigenschaften, so wird z.B. die Viskosität durch die Länge der Makromoleküle bestimmt (HARTMANN, 1974). Die normalerweise gestreckten PG Makromoleküle schnurren unter dem Einfluß von Fixierung, Wässerung und Färbung zusammen und ergeben elektronenmikroskopisch das erwähnte Bild von Zentralgranulum und Filamenten (MERKER und GÖNTHER, 1973; UTSCH, 1972).

Der weitmaschige Interzellularraum des Mesenchyms wird also von einem Netzwerk von PG-Strukturen ausgefüllt, deren Mukopolysaccharidanteil hauptsächlich Hyaluronsäure enthält. Diese PG kontrollieren den Flüssigkeits- und Substrathaushalt des Interzellularraumes, in den später Kollagen sezerniert wird. (KREYSEL und KIMMIG, 1975).

III Kollagen

Chemisch ist Kollagen ein hochmolekulares, fibrilläres Protein, das sich durch einen hohen Gehalt an Glycin und Hydroxyprolin auszeichnet (BALAZS, 1970; BHATNAGAR und RAPACKA, 1971; GRAßMANN, 1955; PROCKOP, 1969). Es wird in den membrangebundenen Ribosomen der ortsständigen Fibroblasten gebildet (BURNS, 1973; MERKER, 1974; SCHWARZ, 1964). Aus diesem Grund ist es allein mit morphologischen Kriterien möglich, die Kollagensyntheseleistung der Fibroblasten an der Zahl und dem Ausmaß seiner endoplasmatischen Membranen zu beurteilen. Die Synthese geschieht wie bei anderen Proteinen durch sequentielle Anordnung von Aminosäuren, bis die genetisch determinierte Kette von ca. 1000 Aminosäuren erreicht ist. Ein solches Protein mit dem MG 100 000 besteht aus einer Folge von Triplets der Formel Glycin-x-y, wobei x und y für jede beliebige Aminosäure stehen, hauptsächlich aber für Prolin (BHATNAGAR und RAPACKA, 1971; BORNSTEIN und EHRlich, 1972; KIVIRIKKO, 1974; PIETZ, 1970; PROCKOP, 1969). Dieses als Protokollagen oder pro- α -Kette bezeichnete Protein enthält noch kein Hydroxyprolin. Die Hydroxylation erfolgt nämlich erst nach der Lösung der Polypeptidkette von den Ribosomen in das Grundzytoplasma (MERKER und STRUWE, 1971; PROCKOP, 1969) durch die Prolin- bzw. Lysinhydroxylase. Dazu werden α -Ketoglutarinsäure, zweiwertiges Eisen, molekularer Sauerstoff und Ascorbinsäure benötigt (HUTTON, 1966; KIVIRIKKO, 1974; PIETZ, 1970). Einige Hydroxylsinkereste werden glykolytisch durch Kopplung mit Glukose und Galaktose oder oxydativ desaminiert zu Aldehyden (PROCKOP, 1969; PIETZ, 1970). Damit ist die Synthese des Kollagenmoleküls, jetzt α -Kette benannt, beendet.

Wie das Syntheseprodukt in das Hohlraumssystem des rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) gelangt, wo es gestapelt wird, ist nicht bekannt. Genügend große Poren in den doppelt strukturierten Membranen des rER, die die relativ großen Moleküle ($5 \text{ \AA} \times 2800 \text{ \AA}$) passieren könnten, sind nicht nachgewiesen. Jedenfalls lassen sich elektronenmikroskopisch bis $60 \text{ \AA}$ dicke Filamente im rER nachweisen, die auf eine bereits intrazellulär erfolgte Aggregation von α -Ketten zu größeren Komplexen schließen läßt. Es sind dies Vorstufen von Tropokollagenmolekülen, die aus α -Ketten eine dreisträngige Helixstruktur von $12 \text{ \AA}$ Durchmesser bilden. Das MG

beträgt 360 000. Die Quervernetzung der Polypeptidketten erfolgt zum Teil durch Kondensation eines Aldehyds der einen Kette mit dem Aldehyd oder einer ϵ -Aminogruppe der anderen Kette (PIETZ, 1970), zum Teil durch Wasserstoffbrücken und elektrostatische Kräfte (SCHWARZ, 1964; GRABMANN, 1955). Man nimmt an, daß besondere, endständige Aminosäureketten dazu dienen, die Helixstruktur zu formieren (BORNSTEIN, EHRLICH, WYKE, 1972). Ist die typische Struktur gebildet, werden die tryptophanreichen Aminosäurenendstücke durch ein proteolytisches Enzym (Prokollagenpeptidase) abgespalten und erst jetzt ist das Tropokollagenmolekül endgültig fertiggestellt (LAPIERE und PIERARD, 1974; PIETZ, 1970). Es wird diskutiert, daß jene Endstücke dazu dienen, die intrazelluläre Fibrillogenese zu verhindern. Allerdings kommt es im ER bereits zur oben erwähnten Aggregation einzelner Tropokollagenmoleküle, denn Filamente bis 60 Å Durchmesser - entsprechend 4 Tropokollagenmolekülen - sind nachgewiesen. Ihr unregelmäßiger Verlauf, sowie das Vorkommen von Granula, spricht dafür, daß sie noch ungeordnet und nicht gestreckt verlaufen. Ihr Aggregationszustand ist nicht bekannt. (MERKER und STRUWE, 1971). Weiter ungeklärt ist der Sekretionsweg dieser Kollagenvorstufen in den Extrazellulärraum (GOLDBERG und Green, 1964; EHRLICH und BORNSTEIN, 1972; MERKER, 1961; ROSS und BENDITT, 1965; SCHWARZ, MERKER, KUTZSCHE, 1967). Es wäre ein Ausschleusungsmechanismus analog dem der PG Sekretion denkbar (GOLDBERG und GREEN, 1964; SCHIPP, 1969), aber dies scheint quantitativ schwer möglich, da die Zahl der Golgi Vesikel klein ist im Verhältnis zum Volumen des bei großer Syntheseleistung stark aufgeblähten ER.

Das Sekretionsprodukt erscheint als sog. "marginale Kondensation" auf der Zelloberfläche. Tropokollagen und PG liegen ungeordnet dem Plasmalemma auf. Unter dem Einfluß der Prokollagenpeptidase und sicher der Proteoglykane beginnen sich die Tropokollagenmoleküle zu strecken und sich an die Matritzen der Grundsubstanz anzulagern. Es entstehen die ersten Kollagenfilamente (Durchmesser >80 Å, ohne Querstreifung), die sich parallel zueinander orientieren, verschmelzen und weiter aggregieren, bis schließlich die

charakteristischen quergestreiften Fibrillen entstehen. Dieser Vorgang der Anlagerung von Tropokollagenmolekülen um einen Kern heißt "Nukleation". Ist ein Durchmesser von 150 Å erreicht, wird die Querstreifung sichtbar. Vielleicht ist sie ein quantitatives Problem der Projektion von Seitenketten oder reaktiven Gruppen, sodaß Banden unterschiedlicher Dichte quer zur Längsachse die Querstreifung ausmachen. Die Querstreifung der Fibrille mit der typischen Periode von 640 Å beruht auf der jeweils um ein Viertel ihrer Länge verschobenen seitlichen Anlagerung der 2800 Å langen Tropokollagenmoleküle. In vivo und in vitro kommen noch andere Perioden vor, sie werden mit anderen Verschiebemustern erklärt.

Die Fibrillen der ersten Ausstattung haben in verschiedenen Organen einen Durchmesser von 100 - 250 Å. Sie sind bereits belastbar. Unter funktioneller Belastung kommt es zu einer für jedes Organ und jede Spezies charakteristischen Fibrillendicke (SCHWARZ, 1964). Es können Verteilungskurven von Fibrillendurchmessern geschrieben werden: die dünnsten Fibrillen findet man in der Cornea, dicke Fibrillen in dem mechanisch stärker beanspruchten Corium oder in der Sehne. Ebenso besteht eine Altersabhängigkeit. Der Fibrillenumfang nimmt so lange zu, bis ein der Funktion adäquates Dickenwachstum erreicht ist. Im Alter, in der Regressionsphase, nimmt die Fibrillendicke wieder ab. Unter konstanten Bedingungen und gleichbleibender funktioneller Belastung garantiert ein Erhaltungsstoffwechsel (turn-over) das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau von Fibrillen und Grundsubstanz.

Die Fibrillen sind nicht der letzte Baustein in der Bindegewebsentwicklung, sie lagern sich zur nächstgrößeren Einheit, den Fasern, zusammen, und diese wiederum bauen eine ortstypische Textur auf, und erst dann gilt die normale Bindegewebsentwicklung als abgeschlossen.

Mit der Ordnung und Umordnung der Fasersysteme, sowie der experimentellen Richtungsbestimmung kollagener Fibrillen beschäftigte sich Benninghoff schon um 1930 unter dem Thema der "funktionellen Anpassung im Bereich des Bindegewebes" (BENNINGHOFF, 1931). Er fand heraus, daß Bindegewebe von Zugspannungen gerichtet wird: nach Herausnahme eines Stückchens der Rückenhaut der Maus hätten sich die Bindegewebsmaschen im Corium mit ihrer

Längsachse radiär auf die Narbe eingestellt. Der Verlauf der Fibrillen werde also durch Wachstumsspannungen in der fibrillenbildenden Grundsubstanz bestimmt. Zu ähnlichen Ergebnissen kam WEISS (1929), der Fibroblastenkulturen unter definierten Zugspannungen untersuchte und postulierte, daß die Wachstumsrichtung von Fibrinfasern proportional der Spannungsrichtung sei, ebenso wie die Wachstumsintensität der Spannungsintensität. Eine dem Verlauf der Spannungsvektoren gleichgerichtete Struktur fungiere als Leitgerüst, das nicht genetisch determiniert ist, sondern in einem Zustand ursprünglicher Labilität verharre und sich erst nach und nach stabilisieren und im weiteren Entwicklungsprozeß konsolidieren müsse. Die experimentell gut untermauerten Befunde haben viel zum Verständnis der Entwicklung hochgeordneter Bindegewebsysteme beigetragen (HACKELBERG, 1971). Nur lassen sie aus erklärbaren Gründen das Wechselspiel der PG mit den entstehenden Kollagenfibrillen im Interzellularraum außer Betracht; denn die PG weisen ebenfalls eine hochgeordnete Struktur auf und ihre chemischen wie morphologischen Zusammenhänge mit den Kollagenfasern rücken immer mehr ins Blickfeld der Bindegewebforschung.

IV Kollagen und Proteoglykane

Tropokollagen und Proteo-Chondroitinsulfat haben während der Nukleation die erste Möglichkeit miteinander zu reagieren. In vitro Versuche ergaben beträchtliche Unterschiede des Molekulargewichtes und der Symmetrie von Kollagenfasern, denen während der Nukleation Chondroitinsulfat gefehlt hat. Spontane Aggregation von Tropokollagenmolekülen gelingt auch aus sich selbst heraus und bedarf nicht der Anwesenheit einer Zelle oder Zellbestandteile. Daraus folgt, daß die Charakteristika der fertigen Kollagenfibrillen schon während der Nukleation determiniert werden (ÜBRINK, 1970).

Es gibt eine große Reihe von Untersuchungen über Wechselwirkungen von Kollagen und PG. Danach reagieren Proteoglykane auf Grund ihrer unterschiedlichen MPS Zusammensetzung unterschiedlich mit Kollagen, wobei die chemische Struktur und die Konformation der MPS die bestimmenden

Faktoren sind (GELMAN und BLACKWELL, 1974). Die Peptidketten am Ende des Tropokollagenmoleküls reagieren mit den sulfatierten Polysaccharidketten der PG. Die Präzipitation ist abhängig von elektrostatischen Kräften zwischen den sulfurierten Polysaccharidgruppen und den basischen Aminosäureenden des Tropokollagen (LOWTHER et al., 1970). Der Effekt auf die Fibrillenausrichtung ist aber nicht nur von der Ladung, sondern auch von der Molekülgröße, also sterischen Faktoren, abhängig. Merker und Günther haben 1973 mittels der Rutheniumrot-Färbung elektronenmikroskopisch die geordnete Lokalisation der PG an der Fibrilloberfläche darstellen können. Sie liegen in Abhängigkeit zur Querstreifung in Abständen von 640 Å der Oberfläche an, der sie durch feine Fäden verbunden sind. Im Verlauf des weiteren Faserwachstums rücken die Rutheniumrot-positiven Strukturen enger an die Fibrillen heran und imponieren dort als plumpe Fortsätze einer bestimmten Querbande.

Die Wechselwirkung zwischen Kollagenfibrille und PG-Molekül wird durch das "bottle-brush" Modell von Mathews (1970) veranschaulicht: vom Proteincore des PG gehen die Polysaccharidketten wie "Borsten" ab und verflechten sich mit den Kollagenfibrillen, sodaß hintereinander in einer Ebene Kollagenfibrille auf Polysaccharidkette, Proteincore, Polysaccharidkette, Kollagenfibrille usw. folgen. Weiteres Wachstum erfolgt durch Zuwachs neuer Fibrillen, Tropokollagenmolekülen und Proteoglykanen bis zur entsprechenden Faserdicke. Welches nun die limitierenden Faktoren beim Dickenwachstum dieser Fasern sind und warum sie scheinbar ungeordnete Richtungsverläufe einnehmen, ob die Lage der kollagenen Bündel im Interzellularraum rein zufällig ist, diese Fragen können trotz tiefer Einblicke in die biochemischen Interaktionen nicht beantwortet werden und damit bleiben noch wesentliche Fragen hinsichtlich der Morphogenese der Haut unbeantwortet. Übereinstimmung herrscht nur darüber, daß die PG ein Grundmuster abgeben für die Kollagenfibrillen, daß sie in bestimmter Weise mit dem kollagenen Molekül reagieren und seine Triplehelixstruktur stabilisieren sowie neugebildete Fasern einbetten und zementieren. (GELMAN und BLACKWELL, 1973; GREILING, 1974; HONYA, 1974; LOWTHER et al., 1970; LOWTHER und NATARAJAN, 1972; MATHEWS, 1970; ÜBRINK, 1973;

SERAFINI-FRACASSINI et al., 1970; SMITH und FRAME, 1969; TOOLE und LOWTHER, 1968). Einige der aufgeworfenen Fragen sind aber nur mit morphologischen Methoden zu beantworten. Hier liegen bislang noch zu wenig Befunde vor. Wir untersuchten deshalb elektronenmikroskopisch solche Stadien während der Entstehung und der Reifung der Cutis von Ratten, die eine Bündelung von Fibrillen zu Fasern und die Ausrichtung dieser Fasern zeigen.

Material und Methoden

Die folgenden licht- und elektronenmikroskopischen Befunde wurden an Mäuseembryonen und Mäusen des Inzuchtstammes NMRI der Tage 15 - 18, bzw. 0 - 6 post partum erhoben. Die Tiere wurden in temperatur- und feuchtigkeitsgeregelten Räumen bei umgekehrtem Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Paarung erfolgte im Oestrus zwischen 7.30 und 9.30 Uhr. Der Schwangerschaftsbeginn, d.h. der Zeitpunkt 0, wurde auf 8 Uhr festgesetzt, da zu diesem Zeitpunkt bereits 80% der Weibchen spermienpositiv sind.

Für unsere Untersuchungen wurden folgende Entwicklungsstadien berücksichtigt: die embryonalen Tage 15, 16, 17 und 18, sowie die postpartalen Tage 0,2,4 und 6. Als Präparat diente die Haut der hinteren Extremität im Achillessehnenbereich.

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden die Embryonen bzw. jungen Mäuse in üblicher Weise je nach Größe einige Stunden in einer modifizierten Karnovsky-Lösung (3% Formaldehyd, 3% Glutaraldehyd in 0,2 M Cacodylatpuffer <pH 7,2>) fixiert. Nach dem Waschen in Pufferlösung wurde 1 Stunde mit 1% OsO_4 Lösung nachfixiert. Der stufenweisen Entwässerung in der Acetonreihe folgte die Einbettung in Micropal (= Vestopan der Firma Ferak, Berlin). Die eingebettete Extremität wurde als kegelförmig zugespitzter Block derart herausgeschnitten, daß die geforderte Lokalisation in der Kegelspitze lag. Zur genauen Orientierung stellten wir vor Anfertigung der Dünnschnitte sogenannte Semi-

dickschnitte her ($1/2 - 1 \mu$). Diese Giemsa nachgefärbten Präparate wurden lichtmikroskopisch beurteilt und durch das Zeiss Photomicroscop Standard Universal dokumentiert. Die Dünnschnitte wurden am LKB-Microtom angefertigt und mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden am Zeiss Elektronenmikroskop 10 und Siemens Elmiskop vom Typ Ia mit einer Primärvergrößerung von 1 : 1000 bis 1 : 20 000 durchgeführt. Die Positiv-Papiervergrößerungen sind ca. 3 $1/2$ fach.

Resultate

Lichtmikroskopische Befunde

Auf eine streng chronologisch orientierte Befunderhebung soll verzichtet werden zugunsten einer eher schematischen Beschreibung der licht- und elektronenmikroskopischen Phänomene während der Entwicklung der kollagenen Strukturen zu Fasern. Es scheint hier eher von Vorteil, sich an den einzelnen morphologischen Entwicklungsstadien zu orientieren, als das Alter des Tieres zur Einteilung heranzuziehen, da in einem Präparat viele Entwicklungsstadien kollagener Fasern nebeneinander existieren. Andererseits treten in dem von uns berücksichtigten Untersuchungszeitraum beträchtliche morphologische Veränderungen auf. Es soll deshalb zum besseren Verständnis kurz auf die Entwicklung der Haut und die morphologischen Beziehungen der verschiedenen Strukturen zueinander eingegangen werden.

Das Epithel weist am 15. Embryonaltag bereits zwei, manchmal mehrere Schichten auf. Die Interzellularräume werden in den weiteren Tagen kleiner und die oberflächliche Epithellage plattet ab. Die Zellen stellen sich mit ihrem größten Durchmesser oberflächenparallel, die Zellkerne werden pyknotisch und verschwinden. Am Tag 16 treten die ersten Zeichen einer Verhornung auf; die Peridermschicht wird dabei abgestoßen und die Körnerzellschicht mit den Keratohyalin granula ist am Tag 17 voll ausgebildet. Typische Hornlamellen sind am Tag der

Geburt zu sehen. Zu diesem Zeitpunkt ist auch die Schichtung der Epidermis vollständig. Sie läßt sich jetzt in die drei Hauptschichten stratum germinativum, stratum granulosum und stratum corneum unterteilen.

Das Corium besteht am Tag 15 aus einem sehr lockeren Verband polygonaler und polymorpher Bindegewebszellen, die etwa die gleiche Größe wie die Epithelzellen haben. An der Epithel - Bindegewebsgrenze imponiert eine dichtere Stellung der Mesenchymzellen unterhalb des Epithels. Die Haaranlagen lassen sich zu diesem Zeitpunkt auch erstmals erfassen. Sie entwickeln sich aus einer Vorwölbung der epithelialen Basalzellschicht in die Dermis, um die sich das Mesenchym zu einer kappenförmigen Mesenchymzellanhäufung verdichtet. Der Haarkeim wächst dann zum Haarzapfen aus, wird am Tag 17 zum Bulbuszapfen und erreicht schließlich bis zur Geburt das Stadium des Scheidenhaares, in dem bereits Verhornung aufgetreten ist. Postpartal findet man deshalb eine Aufreihung von Haaranlagen aller Entwicklungsstadien. Jetzt wird auch eine Zweischichtung des Corium deutlich: zum Epithel hin scheinen die Fibroblasten dichter gepackt und die Interzellularräume enger. Die Zellen sind zunächst polygonal und ohne Richtung, nur in unmittelbarer Nähe der Haaranlagen sind sie bipolar und formieren sich um die Haaranlage herum in einheitlicher Richtung schräg zur Epithel - Bindegewebsgrenze. Am 6. postpartalen Tag erscheinen auch die nicht in unmittelbarer Nähe der Haaranlagen liegenden Fibroblasten gestreckt und mit langen, undulierenden Zellfortsätzen. Sie sind entweder circular zu den Haaranlagen oder mehr gestreckt zum Oberflächenepithel hin ausgerichtet.

In der eigentlichen Cutis sind die Fibroblasten kleiner und vorwiegend bipolar (Tag 18) und bilden zwischen dichter Interzellulärsubstanz in mehreren Schichten einen bindegewebigen Zellverband angedeutet parallel zur Epithel-Bindegewebsgrenze.

Auffällig in unseren Präparaten von der prae- oder postnatalen Haut der Mäuse waren die vielen Mastzellen mit zahlreichen Sekretgranula.

Elektronenmikroskopische Befunde

Mit dem höheren Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskopes und der Anwendung einer besseren, d.h. schonenderen Präparationstechnik lassen sich die Form der im Lichtmikroskop polymorph erscheinenden Fibroblasten des subepithelialen Mesenchyms und die Verhältnisse des Interzellularraumes genauer darstellen. Bereits am Tag 16 strahlen von den Fibroblasten lange Fortsätze aus, die - wie aus Querschnitten hervorgeht - platten- bis röhrenförmig sein können. Die Länge dieser Fortsätze kann nicht exakt elektronenmikroskopisch bestimmt werden, da sie häufig aus dem dünnen Schnitt (2500 Å) nach oben oder unten herauslaufen. Während zu diesem Zeitpunkt (Tag 16) noch die meisten dieser Mesenchymzellen (wie auch das lichtmikroskopische Bild, siehe dort, beweist) mehr plump und polygonal sind, strecken sie sich zu einer bipolaren Form mit Betonung des jeweils endständigen Fortsatzes, besonders um die sich entwickelnden Haaranlagen herum.

Cytologisch sind diese Zellen bereits jetzt charakterisiert durch ein reichlich entwickeltes rauhes endoplasmatisches Retikulum. Diese membranbegrenzten Hohlräume können eng gestellt oder aber gebläht und erweitert sein. Die geblähten Abschnitte enthalten meistens ein feingranuläres - feinfilamentäres Material. Daneben kommen noch runde bis ovale Mitochondrien vom Crista-Typ, ein Golgi-Apparat und viele freie Ribosomen zu Polysomen gruppiert vor. Die Kerne sind relativ groß. Das Karyoplasma in großen Bezirken aufgelockert. Vorwiegend im Randbereich finden sich Chromatinverdichtungen. Häufig können 1 - 2 gut ausgebildete Nucleoli in einer Schnittebene getroffen sein.

Der Interzellularraum (ICR) erscheint bei niedrigen Vergrößerungen weitgehend leer. Erst bei genauerem Hinsehen und mit besserer Auflösung lassen sich einige isoliert liegende oder bereits gebündelt verlaufende kollagene Strukturen (Filamente und Fibrillen) erkennen. Sie haben einen Durchmesser von etwa 200 Å und zeigen noch keine deutliche Querstreifung. Da nach der üblichen Nomenklatur als Filament die kollagenen Strukturen bezeichnet werden, die noch keine Querstreifung aufweisen, die mit Querstreifung dagegen Fibrillen, handelt es sich

hier meistens noch um Filamente. Einige zeigen aber bereits regelmäßig wechselnde Kontrastunterschiede, sodaß -wie sich aus den Bildern der nächsten Tage ergibt- das Stadium der Fibrillen bei vielen gerade erreicht ist.

Während bei den Einzelfilamenten keine deutliche räumliche Beziehung zu irgendeiner anderen Struktur besteht, verlaufen die längsgetroffenen Bündel häufig parallel zur Zellmembran benachbarter Zellen, bzw. ihrer Fortsätze. Der Verlauf von quergetroffenen Bündeln läßt sich natürlich aus den praktisch zweidimensionalen Schnitten nicht ablesen und entzieht sich damit unserer Beurteilung. Einige sehr kleine Bündel kollagener Filamente, die also nur aus sehr wenigen (3-7) Einzelfilamenten bestehen, liegen den Zellmembranen direkt an.

Bei höherer Vergrößerung, besonders nach Anwendung der Färbungsmethode mit Rutheniumrot, zeigt sich, daß der übrige ICR optisch nicht leer ist. Neben den oben beschriebenen kollagenen Strukturen kommen noch elektronendichte Granula vor, die einen Durchmesser von 300-700 Å haben und von denen aus feine Filamente (70 Å) in die Umgebung ausstrahlen. In Analogie zu anderen Untersuchungen an embryonalem Material vergleichbaren Alters (Merker und Günther, 1973) kann angenommen werden, daß es sich hier um die zweite Komponente des mesenchymalen ICR handelt, um die Proteoglykane verschiedener Typen. An einigen Stellen bestehen diese Strukturen fast nur aus den zentralen Granula, an anderen dagegen überwiegt der filamentäre Charakter. Die Zahl dieser Proteoglykan-Strukturen wechselt allerdings lokalisationsabhängig sehr. Einige homogen aussehende, vor allem um kollagene Bündel liegende und dort auch feinfädige Strukturen sind wenig kontrastgebend, aber ihre nahe räumliche Beziehung zu den Zellfortsätzen tritt deutlich hervor. In den Übersichtsaufnahmen sind diese Strukturen fast regelmäßig auf den ICR

verteilt, sie sind gesprenkelt, und je enger der ICR, desto kontrastreicher wirken sie. Am deutlichsten werden sie in der Nähe kollagener Bündel, dort sind sie besonders dicht und eng gepackt.

Am Tag 18 erscheint der ICR insgesamt weniger leer als am Tag 16. Man sieht jetzt mehr quer und längs getroffene Bündel kollagener Fibrillen. Es zeigt sich eine beginnende Querstreifung, aber noch ohne deutliche Periodizität. In den Längsschnitten sind häufig etwa 10-15 Fibrillen nebeneinander und sogar bis zu 40-60 Fibrillen im queren Durchmesser zu erkennen. Das hängt natürlich von der Lage der Schnittebene ab. Die Bündel verlaufen nicht gestreckt sondern etwas geschlängelt. Eine Vorzugsrichtung läßt sich nicht erkennen. Dort wo besonders zahlreiche kollagene Bündel vorkommen und gerade an Schnittpunkten quer und längs getroffener Fasern, fällt eine feinfädige Struktur auf, die wabenförmig oder wie ein zerrissenes Netz den ICR ausfüllt. Es entspricht dem fädigen Typ der eben besprochenen Proteoglykane. Dieses Netzwerk hat enge Beziehung zu den kollagenen Fasern. In den quergetroffenen kollagenen Bündeln verbinden sie die Fibrillen untereinander, wobei der einzelnen Fibrille eine Stechapfelform verliehen wird. An den längsgetroffenen kollagenen Fasern strahlen die Fäden von allen Seiten auf die Faserbündel ein und schmiegen sich ihnen an. Dort wo die Fibrillen nicht so eng aneinander liegen, sodaß man noch einen deutlichen Spalt erkennt, sieht man eine fädige Seit-zu-Seit Vernetzung. Einzelne Bündel kollagener Fibrillen können beschrieben werden, die in der Mitte ihrer Verlaufsrichtung eng gepackt sind und zum Ende hin fächerförmig auseinanderziehen, sodaß sich öffnende Spalträume entstehen, die in den freien ICR münden. Dort ist die seitliche Verknüpfung mit fädigen Strukturen besonders deutlich. Es bestehen ebenfalls solche fädigen Verbindungen zwischen den Fibroblastenfortsätzen und kollagenen Elementen. In den übrigen weiten Räumen des ICR, die

weitgehend kollagenfrei sind, erscheinen die fädigen Strukturen nur vereinzelt, so als wäre die Kontinuität eines den ganzen ICR ausfüllenden Netzwerkes verloren gegangen und hätte sich hauptsächlich in der Umgebung kollagener und zellulärer Strukturen erhalten. An kollagenen und zellulären Strukturen wären sie also miteinander verklebt und in den freien Räumen, wo es keine Haft-Klebeunkte gibt, nur als fädige Strukturen übrig geblieben.

Je weiter die Coriumentwicklung fortschreitet, desto dichter werden die Interzellularräume ausgemauert mit kollagenen Fibrillenbündeln. Diese Ausfüllung geschieht durch Vermehrung und durch Vergrößerung der kollagenen Fibrillenbündel. Je größer der Umfang eines solchen Bündels wird, d.h. einer typischen Faser aus quergestreiften Fibrillen mit der charakteristischen Periodizität, desto weiter liegt meistens die Faser von der Membran der jeweils benachbarten Zelle entfernt und umso weniger kann man Richtungsbeziehungen zwischen Cytoplasmamembranverlauf und Faserverlauf ausmachen. Nur dort, wo zwischen zwei Fibroblasten oder ihrer Ausläufer wenig Platz ist, liegen die Fibrillenbündel -wenn sie annähernd längs getroffen sind- parallel zur Cytoplasmamembran.

In der weiteren Entwicklung werden die Faserverläufe insgesamt länger, Fasern mit ihren leicht fächerförmig aufgeweiteten Enden bekommen Beziehung zueinander und verbinden sich dergestalt, daß die Faser über die Distanz ihrer Lände ein einheitliches Bild parallel verlaufender Fibrillen liefert. Das könnte einmal bedeuten, daß die Fibrillen und damit die von ihnen aufgebauten Fasern tatsächlich in die Länge wachsen. Andererseits könnten die undulierend verlaufenden frühen Bündel sich mit zunehmender Reife und damit Dicke auch mehr strecken und damit die Wahrscheinlichkeit eines exakten Längsschnittes größer werden. Länge und Umfang einer fertigen Faser sind durchaus unterschiedlich. Es lassen sich aber keine Parameter aufstellen, nach denen ortstypische Zusammenhänge beständen zwischen Morphologie und Lokalisation einer Faser.

Es sieht aber so aus, als könnte man an Hand eines einzelnen Bildes sagen, ob sich eine kollagene Faser noch im Stadium der Entwicklung befindet, d.h. in ihrem Dicken- oder eventuell auch Längenwachstum. Wenn im Längsschnitt die Fibrillen in der Faser streng parallel verlaufen und die Abstände der Fibrillen zueinander auch zum Faserende hin gleich bleiben, bzw. wenn im Querschnitt die getroffenen Fasern jeweils identische Abstände haben, dürfte das Faserwachstum an dieser Stelle beendet sein. Der Abstand zwischen den Rändern benachbarter Fibrillen beträgt dann weniger als 100 Å, in 'unreifen' Fasern kann er bis zu 500 Å betragen.

Am Tag 2 p.p. ist das Faserwachstum noch voll im Gange, wenn- gleich nach obiger Definition bereits viele fertige Fasern vorhanden sind. Man sieht noch frische kollagene Ausfällungen direkt auf der Cytoplasmamembran. Daß die Fibroblasten noch eine große Syntheseleistung vollbringen, wird auch an den weiten Räumen des rauen endoplasmatischen Retikulum und an der großen Zahl der Golgivesikel deutlich.

In den Übersichtsaufnahmen der postpartalen Coriumentwicklung erkennt man eine deutliche Zunahme kollagenen Materials in den Interzellularräumen. Erstmals kann ein grob quantitatives Überwiegen entweder quer oder längs verlaufender Fasern innerhalb eines Interzellularspaltes festgestellt werden. Besonders deutlich ist dies in den ICR um die Haaranlagen, eine Besonderheit, die noch durch den gerichteten Zellverlauf der bipolaren Fibroblasten schräg zur Haaranlage unterstrichen wird, wie es schon lichtmikroskopisch dokumentiert wurde. Diese Vorzugsrichtung kann auch durch die Übersichtsaufnahmen im Elektronenmikroskop bestätigt werden. Weiter fällt der wellenförmige Faserverlauf auf, der -natürlich mit Abweichungen- einer Sinuskurve ähnlich ist, nämlich identisch in Frequenz und Amplitude der Welle. In einzelnen Aufnahmen bei höherer Vergrößerung, besonders dort, wo der ICR weniger dicht ausgefüllt ist, kann man in allen bisher untersuchten Stadien eine Vorzugsrichtung auch der Proteoglykanstrukturen

des ICR ausmachen. Dabei verlaufen solche Proteoglykanfäden meistens in einiger Entfernung zu der Faseroberfläche, seltener innerhalb einer Faser parallel zur Richtung der Faser. Dabei können durchaus Fasern sich kreuzen, oder benachbarte Fasern einen unterschiedlichen Verlauf haben. Bei quergetroffenen Fibrillenbündeln fällt eine Erfassung des Fadenverlaufes naturgemäß schwer. Offenbar besteht also ein im Raum dreidimensional orientiertes Netzwerk von Proteoglykanfäden, die eine regelhaft räumliche Beziehung zu den in diesem Raum verlaufenden kollagenen Strukturen haben.

Diskussion

Nach der von uns erfaßten Literatur und nach unseren eigenen Untersuchungsergebnissen lassen sich die Befunde zusammenfassend folgendermaßen darstellen:

Das Corium in der untersuchten Periode besteht zunächst aus einem Verband von Bindegewebszellen, die locker gepackt sind und deren Zwischenräume nur spärlich ausgefüllt sind mit kollagenen Strukturen. Die übrigen Bereiche enthalten Proteoglykane (PG). Nach den bisher formulierten Vorstellungen (Merker und Günther, 1973) muß angenommen werden, daß die vorwiegend fädigen Strukturen den Hyaluronsäure-haltigen PG, die granulären dagegen den Chondroitinsulfat-haltigen PG entsprechen. Wie aus diesen Arbeiten hervorgeht, läßt sich die elektronenmikroskopische Darstellung dieser Substanzen leider nicht quantitativ verwerten, da durch Einflüsse während der Präparation ein Herauslösen und eine Veränderung vermutet werden muß (siehe unten).

Die Fibroblasten bieten über den ganzen Beobachtungszeitraum ein ausgeprägtes Schlauchsystem des rauhen endoplasmatischen Retikulum (rER). Dies ist an einigen Stellen cysternenartig aufgebläht, was für eine große Syntheseleistung und Stapelung von Kollagenvorstufen spricht (Merker, 1961; Merker, 1974; Schwarz, 1964).

Arbeiten aus jüngster Zeit versuchen die Frage der Kollagensekretion vom rER in den Interzellularraum (IZR) auf biochemisch - autoradiografischem Wege zu lösen (Nist et al., 1975; Olsen, 1975). In ihnen konnte nachgewiesen werden, daß die spezifischen Hydroxylasen ausschließlich an die Räume des rER gebunden sind. Wird die Prolinhydroxylase spezifisch gehemmt, so kommt es zu einer Akkumulation von Protokollagen in den Räumen des rER, da nicht hydroxyliertes Protokollagen nicht weiter sezerniert werden kann. Auf diese Weise kann in der Aktivität dieses Enzyms ein Regelmechanismus für die Menge des in den ICR zu sezernierenden Protokollagen vermutet werden. Prall gefüllte Cysternen des rER könnten also auch Ausdruck einer der anfallenden Protokollagenmenge gegenüber vergleichsweise gerin-

gen Enzymaktivität sein. Es käme zu einem Substratdruck, da nicht hydroxylierte Kollagenmoleküle nicht aus dem rER transportiert werden können. Ein quantitatives Mißverhältnis der Volumina des rER und des Golgisystems würde also nicht gegen einen Sekretionsweg des Prokollagen über die Golgivesikel sprechen. Gesichert ist allerdings in diesem Zusammenhang nur die getrennte Sekretion von PG und Kollagen (Merker und Struwe, 1971).

Von dem Vorgang der Synthese und Sekretion des Kollagen und der PG ist für uns zunächst nur morphologisch faßbar die 'marginale Kondensation' von feinfilamentären Kollagenbausteinen und PG auf der Zelloberfläche. Unter der proteolytischen Wirkung der Prokollagenpeptidase strecken sich die Kollagenmoleküle, stapeln sich auf der Zellmembran und verschmelzen (Lapière und Pierard, 1974). Den Vorgang der schrittweisen Anlagerung von Tropokollagenmolekülen um einen Kern und die Aggregation zu größeren Einheiten unter Einschluß von PG nennt man 'Nukleation'.

Es ist bekannt, daß Tropokollagen (TK) Moleküle auch in vitro unter physiologischen Bedingungen spontan aggregieren und ein Gel formen können, das aus nativen Kollagenfibrillen besteht (Lowther et al., 1970). Allerdings besitzen diese Aggregate ein anderes Querstreifungsmuster als die in vivo geformten. Hier findet die Aggregation von TK Molekülen im IZR statt, in dem neben anderen Serumbestandteilen sulfatierte PG vorkommen, die -selbst hochgeordnet- ein fibröses Netzwerk unter Einschluß von Kollagen bilden. Biochemisch und elektronenmikroskopisch sind diese engen Zusammenhänge in Modellversuchen nachvollzogen und als Matrizenprinzip beschrieben (Serafini-Fracassini and Stimson, 1970; Merker und Günther, 1973).

Danach liegen in 600-700 Å Abständen, d.h. in Abhängigkeit zur Querstreifung, Rutheniumrot markierbare Strukturen auf der Fibrilloberfläche. In der reifen kollagenen Faser ist der interfibrilläre Raum völlig mit elektronendichtem Material ausgemauert. Nur an der Oberfläche der Fasern und wachsenden Fibrillenbündel können PG Strukturen gesondert dargestellt werden. Diese PG geben eine Matrice aus fädigen

Strukturen ab, die aus 'Proteincores' mit jeweils zwei identischen Polysaccharidseitenketten pro Proteinmonomer bestehen. Parallel an das Proteincore lagern sich die TK Makromoleküle, wobei die Polysaccharidseitenketten die Vernetzung dieser Verbindungen bestimmen (Serafini-Fracassini and Stimson, 1970). Die Autoren, die sich mit der Biochemie der PG-Kollagen-Komplexe beschäftigt haben, gehen zumeist auf die molekulare Kinetik dieser Wechselwirkungen ein. Deshalb müssen hinsichtlich des Faserwachstum und der Texturentstehung Fragen offen bleiben, die vielleicht auf der Basis unserer Befunde von morphologischer Seite beantwortet werden können. Es sind dies:

1. Welche Faktoren prägen die räumliche Orientierung der Fasern?
2. Welche Faktoren beeinflussen die geordnete Stapelung der Fibrillen zur Faser?
3. Sind die Fasern einem ähnlich hohen Ordnungsprinzip, z.B. einem regelmäßigen Maschenwerk, unterworfen - etwa wie die makromolekularen Bausteine in den Fibrillen, aus denen sie zusammengesetzt sind?

ad 1

Immer wieder wurde in der Literatur auf die Bedeutung der Zellmembran bezüglich der Fibrillogenese hingewiesen (Kajikawa et al., 1959; Goldberg and Green, 1964; Lowther et al., 1970; Magari, 1969; Merker, 1961). Zu dem Zeitpunkt, an dem auf der Zelloberfläche sezerniertes TK ausfällt, kommt es zur Reaktion mit PG. Dabei kann man zwei Schritte unterscheiden (Goldberg and Green, 1964; Øbrink, 1970; Toole and Lowther, 1968):

1. Die 'lag' Phase, die morphologisch als Nukleation und biochemisch als Determination des charakteristischen Fadens erfaßt ist, und
2. die Präzipitationsphase, in der^{es} zur Aggregation der TK Moleküle unter Einschluß von PG um den Nukleus herum kommt.

Die TK-PG-Komplexe werden zunächst durch elektrostatische Kräfte stabilisiert, und zwar zwischen den Sulfatgruppen der Polysaccharide und den basischen Aminosäureresten am Ende der TK Moleküle. Polysaccharidketten mit niedrigem Molekulargewicht und hoher Ladungsdichte (z.B. Heparin) reagieren stark mit Kollagen (Gelman and Blackwell, 1974; Øbrink, 1973). Andere Mukopolysaccharide können sich dagegen

nicht mit Kollagen verbinden, da sie (z.B. Hyaluronsäure) nicht zwei Sulfatgruppen und einen Hexuronsäurerest -also wenigstens zwei negative Ladungen pro Disaccharid- enthalten. Unterschiedliche PG Zusammensetzung bedeutet, daß die Ladungsträger unterschiedlich stark sind und damit eine mehr oder weniger starke Affinität zu den Kollagenmolekülen haben, deren fibrilläre Aggregation dann eine graduell andere thermische Stabilität aufweist.

Das heißt nicht nur, daß die Mukopolysaccharidzusammensetzung der PG Größe und Präzipitationsrate löslicher kollagener Fibrillen beeinflussen, sondern sie bestimmen auch über ihre Wirkung auf und durch die elektrostatischen Kräfte Organisation und Funktion der verschiedenen Bindegewebsarten. Dies ist belegt durch die alters- und ortstypisch bedingten Veränderungen in der quantitativen und qualitativen Mukopolysaccharidzusammensetzung der PG in den verschiedenen Bindegeweben (Lindner, 1974; Schwarz, 1964).

Kommt es demnach in der 'lag' Phase z.B. zu einer Änderung des ionalen Milieus, so müßte dies zu einem atypischen Ablauf der Fibrillogenese führen, etwa einer Änderung des Querstreifungsmusters, der Fibrillendicke oder der Fibrillenstapelung.

Wir können zusammenfassen: Die extrazelluläre Fibrillogenese beginnt mit der Präzipitation von TK Molekülen auf der Zelloberfläche. Wir können diesen Vorgang als marginale Kondensation im Elektronenmikroskop beobachten. Anschließend lagern sich die TK Moleküle in mehr oder weniger geordneten Aggregaten auf der Zellmembran ab, um die Bindung der Polysaccharidketten an das TK Molekül zu ermöglichen. Hier übt die Zellmembran wohl eine richtende Funktion auf die makromolekularen Strukturen aus, eben weil sie dem Sekretionsprodukt nun mal am nächsten liegt und ein stabiles Fundament für den Bau von Fibrillenbündeln bietet. Später, wenn die Fibrillen selbst eine gewisse Stabilität besitzen, werden sie nur dann in unmittelbarer Nähe und in Beziehung zur Zelloberfläche gefunden, wenn der IZR sehr eng ist oder andere, stärkere Strukturelemente wirksam werden.

Die Rolle der Zellmembran bei der räumlichen Orientierung der Fibrillen

ist also keine bestimmende, sondern eher eine 'zufällige'. Primär bestimmend für die Ausrichtung der Fibrillen ist die Mukopolysaccharidzusammensetzung der PG, d.h. das dreidimensionale PG-Grundmuster; ob deren Formation anderen richtungsbestimmenden Kräften zuzuordnen ist, bleibt zu diskutieren.

ad 2

Die geordnete Stapelung der Fibrillen zur Faser bedingt natürlich einen bis zu diesem Zeitpunkt regelrechten Ablauf der Fibrillogenese, insbesondere die Anwesenheit des für Ort und Zeit spezifischen PG-Musters. Im Elektronenmikroskop erkennen wir am Tag 16 in den noch weiten IZR kollagene Bündel mehrreihig übereinander und in lockerer Beziehung zur Zellmembran, aber schon deutlich von ihr entfernt. Es fällt auf, daß diese kollagenen Bündel in ihrer Längsachse immer wieder unterbrochen sind, als wären sie aus Bausteinen einer durchschnittlichen Länge von $2500 \text{ \AA}$ zusammengesetzt. Man könnte deshalb vermuten, daß die Aggregation zunächst nur vorläufig erfolgt zu Elementen, die der ungefähren Länge eines TK Moleküles entsprechen. Solche Bausteine hintereinander aufgereiht auf einer PG Matrizie könnten zusammen schließlich das Register abgeben, das zu der kontinuierlichen Aufreihung von TK Molekülen innerhalb einer Fibrille im typischen Versatzmuster führt.

An dieser Stelle ist zu betonen, daß Längenangaben vorbehaltlich zu betrachten sind, da wir bei einer Schnittdicke von $500 \text{ \AA}$ immer nur einen gewissen Ausschnitt der Faser im Raum verfolgen können.

Wenn beim Aufbau der Fibrillen zu Fasern und damit auch bei der Richtungsgebung von Fasern die PG, besonders die fädigen Hyaluronsäure-haltigen Strukturen eine Rolle spielen, müssen zwei Prämissen erfüllt sein:

1. Diese Substanzen müssen vor dem Auftreten kollagener Strukturen vorhanden sein, und
2. sie müssen tatsächlich an Ort und Stelle nachweisbar sein.

Für die erste Prämisse gibt es genügend Hinweise aus der Literatur (Klöppel, 1969; Lindner, 1974; Merker, 1974; Toole and Lowther, 1968). Es muß davon ausgegangen werden, daß zunächst von den frühen Mesenchymzellen vorwiegend Hyaluronsäure gebildet wird, die alle Interzellularräume ausfüllt und aufgrund ihrer Wasserbindungsfähigkeit auch eine

gewisse mechanische, vielleicht sogar morphogenetische Rolle spielt. Der Nachweis der zweiten Prämisse dagegen ist schwieriger. Tatsächlich wechselt die Menge der PG Strukturen lokalisationsabhängig beträchtlich. Die Löslichkeit und die Veränderungen der PG während der Präparation läßt aber dieses Verhalten erklären. Zweifellos kommt es bei der Fixierung und Wässerung unserer Hautpräparate zu Alterationen der makromolekularen Strukturen im IZR. Die Balance der elektrostatischen Kräfte wird während der Präparation schwer gestört. Es treten die eingangs beschriebenen Knäuelungsvorgänge auf (Merker und Günther, 1973), die das ursprünglich hochgeordnete Bild der Interzellulärsubstanzen verfälschen. So ließen sich demnach die plumpen, homogenen Strukturen auch als PG-Trümmer deuten, die nur noch dort sichtbar sind, wo andere, den Präparationsvorgängen gegenüber widerstandsfähigere Elemente vorhanden sind.

Unter diesem Aspekt sollten wir überall dort wenig alterierte PG Muster antreffen, wo sie den Fixierungs- und Wässerungsabläufen nicht so heftig ausgesetzt sind: In den Lücken und Spalten kollagener Strukturen, in den schmalen IZR und zwischen langen Zellfortsätzen. Dies bestätigt sich und erklärt, warum wir in den späten Abschnitten unseres Untersuchungszeitraumes Reste erhaltener PG Netze -und nicht nur Granula und Filamente- im IZR antreffen, eben weil inzwischen genug Kollagen gebildet wurde, das eine gewisse Stabilität und damit genügend Haftpunkte für die PG Netze bietet.

Da wir aber wissen, daß die PG-haltige Grundsubstanz schon lange vor der Kollagensynthese im IZR vorhanden ist und überhaupt erst die Voraussetzung für eine geordnete Kollagenaggregation schafft, ist es erlaubt, sich an diesen Strukturen zu orientieren und an ihnen den Ablauf der Faserbündelung zu studieren.

Die Fibrillogenese beginnt mit der Stapelung einiger weniger TK Bausteine, bzw. ihrer Aggregate. Den geordneten Ablauf der Stapelung übernehmen die PG. Noch ungeordnete Bausteine sind durch PG mit dem Bündel, dem sie sich anlagern werden, verbunden. Im Verlauf des weiteren Wachstums wird der Kern eines Bündels dichter, die einzelnen Bausteine sind als solche nicht mehr zu erkennen, es entstehen Bündel fibrillärer Strukturen, die zur Peripherie hin etwas auflockern: Sie sind das morphologische Substrat einer

wachsenden Faser. Nach unseren Befunden ist es nicht auszuschließen, daß es neben diesem appositionellen Wachstum aus einzelnen TK Bausteinen nicht auch zu einem Faserwachstum durch Seit-zu-Seit oder End-zu-End Verbindungen von größeren Kollagenkomplexen kommen kann. Ganze Fibrillenbündel können sich dabei in die Aussparungen einer Faser einfügen. Zwischen den Fibrillenbündeln und der Faser liegen gut erhaltene PG Netze. Sie schaffen eine kontinuierliche Verbindung zwischen den Seiten und den fächerig aufgelockerten Enden der kollagenen Strukturen und haben dabei eine wichtige richtungsgebende Funktion. Man muß geradezu vermuten, daß die PG die Fibrillen zu Faserkomplexen zusammenraffen. Morphologische Kriterien für Verteilungsmechanismen von Fibrillen zu dieser oder jener Faser können wir nicht erkennen.

Die einzigen Strukturen, die eine Deutung des Funktionsablaufes zulassen, sind die PG Netze. Sie sind dort zu finden, wos das Faserwachstum abgeschlossen ist. Die Kriterien dafür sind, daß

1. die einzelnen Fibrillen in der Längsachse kontinuierlich und parallel verlaufen
2. die interfibrillären Räume weniger als 100 Å betragen und
3. im Querschnitt die Fibrillen identische Abstände zueinander haben.

Bei hoher Auflösung werden bei den quergetroffenen Fasern feinfädige Verbindungen der Fibrillen untereinander deutlich; die Fibrillen erhalten so eine Stechapfelform. Diese hochgradige Quervernetzung durch PG entspricht der Bedeutung, die man schon in vitro den PG bei der Zementierung und Ausrichtung kollagener Fibrillen zugeordnet hat (Gelman and Blackwell, 1974; Honya, 1974; Lowther et al., 1970; Mathews, 1970; Merker und Günther, 1973; Schwarz, 1964).

ad 3

Die Kollagenfibrille unterliegt einem hohen Ordnungsprinzip. Wenn man den Aufbau von der α -Kette bis zur fertigen Faser verfolgt, liegt es nahe, auch die endgültige Fasertextur gedanklich in dieses Bauprinzip miteinzubeziehen. Am 6. postpartalen Tag sehen wir, daß der IZR dicht ausgefüllt ist mit Kollagenfasern, deren Wachstum nach den oben aufgestellten Kriterien an vielen Stellen abgeschlossen ist. Die Fibroblasten-

fortsätze sind hier sehr lang. In der Übersicht nehmen Fasern und zellu-

läre Elemente einen regelmäßig wellenförmigen Verlauf, etwa parallel zur Epithel-Bindegewebs-Grenze. In der höheren Vergrößerung fällt zwischen den Fibroblastenfortsätzen ein quantitatives Überwiegen jeweils quer oder längs getroffener Fasern auf. Diese Phänomene haben eine einfache Erklärung: Sie sind das morphologische Korrelat der inzwischen eingetretenen mechanischen Belastung. Damit ist ein wesentlicher Faktor zu berücksichtigen, der entscheidend die Texturbildung mitbeeinflußt.

Mit anderen Worten: Die späte Entwicklung kollagener Texturen läßt sich nicht mehr allein mit jenem hochgeordneten Bauprinzip erklären, das seinen Ursprung in identisch replizierbaren makromolekularen Bausteinen hat. Wir können aber die Anordnung der PG wieder zur Deutung der interzellulären Vorgänge im Bindegewebe heranziehen: Kam es zunächst im Mesenchym zur alleinigen Produktion von PG, so wird diese Phase von einer etwa gleichzeitigen Produktion von TK und PG abgelöst. Hier beruht das kollagene Texturmuster auf der Wechselwirkung zwischen TK und PG, bzw. kollagenen Bündeln und PG. Die dritte Phase wird durch Wachstums- und Proliferationsvorgänge im gesamten Hautbereich sowie durch dort auftretende funktionelle Belastungen bestimmt. Gerade im Gelenkbereich -unsere Präparate stammen u.a. aus der Region des Achillessehnenansatzes- wird die Haut besonders beansprucht. Die Fibrillen und Fasern im Corium und Subcutis müssen der örtlichen Beanspruchung als elastische Verschiebeschicht genügen. Wenn der Stütz- und Bewegungsapparat mechanisch belastbar ist und es zu einer regen funktionellen Tätigkeit kommt, muß das Corium die auftretenden Zugspannungen auffangen. Wir finden dies bestätigt:

1. Durch die kräftigeren PG Strukturen, die eine Vorzugsrichtung haben und
2. durch den gerafften und wellenförmigen Verlauf kollagener Fasern unter dem straffen Syncytium der Epidermis.

Dort wo Zugspannungen nur in einer Richtung auftreten, in der Sehne, liegen die Fasern entsprechend parallel. Dort wo Zugspannungen von allen Seiten anfallen, müßte demnach die Fasertextur ausgebildet sein, die diesen Belastungen am ehesten gerecht würde, nämlich ein nach allen Seiten dehnbares, maschenförmiges Geflecht. Dies können wir aus schnittechnischen Gründen im Elektronenmikroskop nur schwierig nachweisen; aber der schein-

bar wirre Faserverlauf braucht einem regelmäßigen Maschenwerk nicht zu widersprechen. Die in einer Ebene angeschnittenen Fasern müssen sogar unterschiedliche Richtungen haben; senkrecht aufeinanderstehende, schräg zueinander oder auch parallele Faserverläufe können durchaus dreidimensional maschenförmig angeordnet sein.

Wenn PG Strukturen, Zellkonturen und Zellausläufer das Auftreten von trajektoriellen Kraft- und Spannungslinien widerspiegeln, so gelten diese Wechselwirkungen auch für den Verlauf von Fasern.

Wir müssen also in der postpartalen Phase der Bindegewebsentwicklung den durch Wachstumsprozesse und funktionelle Belastungen hervorgerufenen physikalischen Kräften eine wesentliche Rolle in der Texturbildung kollagener Fasern zuordnen. Diese Rolle ist aber nur modulierend, sie beruht auf der geordneten Feinstruktur, die sich aus der Interaktion TK-PG ergibt. Diese Feinstruktur ist in ihrer physiologischen Entwicklung keinen Variationen mehr unterworfen. Die Texturbilder, die aufgrund funktioneller Belastung -eben mechanischer Reize- entstanden sind, variieren wahrscheinlich im selben Maße wie die einzelnen Fibrillendurchmesser im Zyklus Wachstumsphase - funktionelle Phase - regressive Phase (Schwarz, 1964). Experimentell belegen konnte dies Benninghoff (1933) durch die Entnahme kleiner Hautareale bei der Maus, was eine Umordnung der Fasersysteme durch die neu aufgetretenen Zugspannungen zur Folge hatte.

Inwieweit alters- und ortstypisch unterschiedliche oder pathologisch veränderte Mukopolysaccharidzusammensetzung der PG die Texturbildung beeinflusst, kann von morphologischer Seite allein nicht beantwortet werden.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wird an Hand elektronenmikroskopischer Befunde über die extrazelluläre Entwicklung kollagener Texturmuster im Corium der Maus berichtet. Der Untersuchungszeitraum umfaßt die embryonalen Tage 16 und 18, sowie die postpartalen Tage 0, 2, 4 und 6. Besonderes Augenmerk richteten wir dabei auf die wechselseitigen Beziehungen zwischen kollagenen Strukturen und solchen, die den Proteoglykanen zuzurechnen sind.

Definitive Voraussetzung für den geordneten Ablauf der extrazellulären Fibrillogenese ist das für Ort und Zeit typische Proteoglykan-Grundmuster. Die Gründe für das polymorphe Erscheinungsbild der Proteoglykane werden erörtert.

Die extrazelluläre Fibrillogenese ist morphologisch zunächst als marginale Kondensation auf der Zellmembran faßbar. Dabei ist die Zellmembran für die Ausrichtung der Fibrillen weniger bestimmend als vielmehr zufällig, da sie dem Sekretionsprodukt Kollagen am nächsten liegt. Wir vermuten, daß die Aggregation kollagener Bündel bausteinartig und vorläufig erfolgt zu Elementen, die der ungefähren Länge eines Tropokollagenmoleküles entsprechen. Derartige Bausteine auf einer Proteoglykanmatrize könnten dann zu einer Fibrille im typischen Versatzmuster aufwachsen. Einzelne Fibrillen und an ihren Enden fächerförmig aufzweigende Fibrillenbündel sind durch Proteoglykan-Netze miteinander verbunden und ergeben das Bild einer wachsenden Faser. Die morphologischen Kriterien einer fertigen Faser sind:

1. In der Längsachse kontinuierlich und parallel verlaufende Fibrillen,
2. die interfibrillären Räume betragen weniger als 100 Å,
3. im Querschnitt getroffene Fibrillen haben identische Abstände zueinander.

Die späte Phase der Coriumentwicklung wird maßgeblich von Wachstums- und Proliferationsvorgängen im gesamten Hautbereich geprägt. Die vor allem postpartal durch funktionelle Belastungen hervorgerufenen physikalischen Kräfte spielen eine wesentliche Rolle bei der Texturbildung kollagener Fasern. Diese Rolle ist aber nur modulierend, sie beruht auf dem vorgegebenen dreidimensionalen Proteoglykanmuster, in dem genetische und frühe funktionelle Einflüsse prägend wirksam werden. Die endgültig geordnete Feinstruktur ergibt sich dann aus der Interaktion von Proteoglykanen und Tropokollagen.

LITERATURVERZEICHNIS

- Balazs, E. A.: ed. Chemistry and Molecular Biology of Intercellular Matrix. Academic Press, London-New York 1-3 (1970)
- Benninghoff, A.: Funktionelle Anpassung im Bereich des Bindegewebes. Ergänzungsheft zum Anatomischen Anzeiger, Bd. 72, Verlag G. Fischer, Jena. 95 (1931)
- Benninghoff, A.: Funktionelle Anpassung. Aus: Handwörterbuch der Naturwissenschaften, 2. Aufl. (Hrsg. R. Dittler u. G. Joos), G. Fischer Verlag Jena 542 (1933)
- Bhatnagar, R. S.; Rapacka, S. S. R.: Cellular Regulation of Collagen Biosynthesis. Nat. New Biology 234, 92-93 (1971)
- Bornstein, P.; Ehrlich, H. P.; Wyke, A. W.: Prokollagen: Conversion of the Precursor to Collagen by a Neutral Protease. Science 175, 544-546 (1972)
- Burns, T. M.; Spears, C. L.; Kerwar, S. S.: Further Studies on the Cell-free Synthesis of Prokollagen-Collagen by Chick Embryo Polysomes. Arch. of Biochem. a. Biophys. 159, 880-884 (1973)
- Ehrlich, H. P., Bornstein, P.: Microtubules in Transcellular Movement of Procollagen. Nat. New Biology, 238, 257-260 (1972)
- Gelman, R. A.; Blackwell, J.: Interaction between Collagen and Chondroitin-6-Sulphate. Connective Tissue Research 2, 31-35 (1973)
- Gelman, R. A.; Blackwell, J.: Collagen - Mucopolysaccharid Interactions at acid pH. Biochimica et Biophysica Acta 342, 254- 261 (1974)
- Gibson, T.; Kenedi, R.M.; Craik, J. E.: The Mobile Micro-Architecture of Dermal Collagen. Brit. J. Surg. 52, 764 (1965)
- Goldberg, B.; Green, H.: An Analysis of Collagen Secretion by Established Mouse Fibroblast Lines. J. Cell Biology 22, 227-258 (1964)
- Graßmann, W.: Unsere heutige Kenntnis des Kollagen. In: Das Leder 10, 241 (1955)

- Greiling, H.: Struktur und Stoffwechsel von Biopolymeren des Bindegewebes als Grundlage der Biomechanik von Bindegewebssystemen. In: Byk Gulden 'Neue Gesichtspunkte zu den Folgen der chronischen Polyarthritits - ihre Feststellung und Behandlung'. Byk Gulden Pharmazeutika, Medizinisch-Wissenschaftliche Abteilung, Konstanz 1974
- Hackelberg, H., H.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Entstehung und Reifung des Corneastromas bei der Ratte. Dissertation an der FU-Berlin (1971)
- Hartmann, F.: Physikalische Eigenschaften der Biopolymere von Bindegeweben als Grundlage der Biomechanik von Bindegewebssystemen. In: Byk Gulden 'Neue Gesichtspunkte zu den Folgen der chronischen Polyarthritits - ihre Feststellung und Behandlung'. Byk Gulden Pharmazeutika, Medizinisch-Wissenschaftliche Abteilung, Konstanz 1974
- Hay, E. D.; Revel, J. P.: Autoradiographic Studies of the Origin of the Basement Lamella in Amblyostoma. Develop. Biol. 7 152 (1963)
- Honya, M.: The Functional Role of Non-Ionic Materials in Collagen Fibril Formation. J. Biochem. 75, 1037-1045 (1974)
- Hutton, J. J.; Tappel, A.L.; Udenfriend, S.: Requirements for α -Ketoglutarate, Ferrous Ion and Ascorbate by Collagen Proline Hydroxylase. Biochemical and Biophysical Research Communications 24, 179-189 (1966)
- Kajikawa, K.; Tanii, T.; Hirono, R.: Electronic Microscopical Studies on Skin Fibroblasts of the Mouse with Special Reference to the Fibrillogenesis in Connective Tissue. Acta Path. Jap. 9, 61-80 (1959)
- Kivirikko, K. J.: Biosynthesis of Collagen in Connective Tissue; Biochemistry and Pathophysiology; ed. by Fricke and Hartmann, Springer Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 107 (1974)
- Klöppel, J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Beginn der Basalmembran- und Fibrillenbildung im Interzellularraum früher Hühnerembryonen. Dissertation an der FU-Berlin 1969

- Kreysel, H. W.; Kimmig, J.: Zur Morphologie, Biochemie und Funktion der Proteoglykane in der Haut. *Der Hautarzt* 26, 111-117 (1975)
- Lapière, C.M.; Pierard, G.: Skin Procollagen Peptidase in Normal and Pathologic Conditions. *Journal of Investigative Dermatology* 62 582-586 (1974)
- Layman, D. L.; Ross, R.: Production and Secretion of Procollagen Peptidase by Human Fibroblasts in Culture. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 157, 451-456 (1973)
- Lindner, J.: Neue Aspekte der Bindegewebs-Grundlagenforschung zur rheumatischen Arthritis. In: Byk Gulden 'Neue Gesichtspunkte zu den Folgen der chronischen Polyarthritits - ihre Feststellung und Behandlung'. Byk Gulden Pharmazeutika, Medizinisch-Wissenschaftliche Abteilung, Konstanz 1974
- Lowther, D. A.; Natarajan, M.: The Influence of Glykoprotein on Collagen Fibril Formation in the Presence of Chondroitin-Sulphate Proteoglycan. *Biochem. J.* 127, 607-608 (1972)
- Lowther, D. A.; Toole, B. P.; Herrington, A. G.: Interaction of Proteoglycans with Tropocollagen. In: E. A. Balazs 'Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix'. Academic Press, London-New York 2, 1135 (1970)
- Luft, J. H.: Ruthenium Red and Violet: Fine Structural Localization in Animal Tissue. *Anat. Rec.* 171, 369-416 (1971)
- Magari, S.: Elektronenoptische Beobachtungen über die Fibrogenese im retikulären Bindegewebe zwischen einzelnen Skelettmuskelfasern. *Acta Anat.* 72, 50-62 (1969)
- Mathews, M. B.: The Interaction of Proteoglycans and Collagen Model Systems. In: E. A. Balazs 'Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix'. Academic Press, New York - London 2, 1155 (1970)
- Merker, H. J.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Fibrillogenese in der Haut menschlicher Embryonen. *Z. Zellforsch.* 53, 411-430 (1961)

- Merker, H. J.: Entstehung und Reifung des Bindegewebes und die pharmakologische Beeinflussung dieser Vorgänge. In: Byk Gulden 'Neue Gesichtspunkte zu den Folgen der chronischen Polyarthritits - ihre Feststellung und Behandlung'. Byk Gulden Pharmazeutika, Medizinisch - Wissenschaftliche Abteilung, Konstanz 1974
- Merker, H. J.: Persönliche Mitteilung 1975
- Merker, H. J.; Günther, Th.: Die elektronenmikroskopische Darstellung von Glykosaminglykanen im Gewebe mit Rutheniumrot. *Histochemie* 34, 293-303 (1973)
- Merker, H. J.; Struwe, K.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Problem der Sekretion der bindegewebigen Interzellularsubstanz. *Z. Zellforsch.* 115, 212-225 (1971)
- Nist, C.; Von der Mark, K.; Hay, E. D.; Olsen, B. R.; Bornstein, P.; Ross, R.; Dehm, P.: Localization of Procollagen in Chick Corneal and Tendon Fibroblasts with Ferritin-conjugated Antibodies. *J. Cell Biol.* 65, 75-87 (1975)
- Übrink, B.: Studies on the Electrostatic Interaction between Collagen and Chondroitin-4-Sulfate. In: E. A. Balazs 'Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix'. Academic Press, London-New York 2, 1171 (1970)
- Übrink, B.: A Study of the Interactions between Monomeric Tropocollagen and Glycosaminglycans. *Eur. J. Biochem.* 33, 387-400 (1973)
- Olsen, B. R.; Berg, R. A.; Kishida, Y.; Prockop, D. J.: Further Characterization of embryonic Tendon Fibroblasts and the Use of Immunoferritin Techniques to Study Collagen Biosynthesis. *J. Cell Biol.* 64, 340-355 (1975)
- Pietz, K. A.: Biosynthesis of the α - Chains of Collagen. *J. Cell. Phys.* 76 389-396 (1970)
- Priest, R. E.: Cellular Replication and Specialized Function of Fibroblasts. *Journal of Investigative Dermatology* 59, 35 (1972)
- Prockop, D. J.: The Intracellular Biosynthesis of Collagen. *Arch. Intern. Med.* 124, 563 (1969)

- Ross, R.; Benditt, E. P.: Wound Healing and Collagen Formation.
J. Cell Biol. 27, 83 (1965)
- Schipp, R.: Die Bedeutung quergestreifter Faserstrukturen für die
Fibrillogenese in der Scheide von Chordomen
bei Amphibienbastardlarven. Protoplasma 67,
345-360 (1969)
- Schwarz, W. : Fibrillogenese und Bildung elastischer Fasern.
Arch. Biol. (Liège) 75, 369-396 (1964)
- Schwarz, W.; Merker, H. J.; Kutzsche: Elektronenmikroskopische Unter-
suchungen über die Fibrillogenese in Fibroblasten-
kulturen. Zeitschr. f. Zellforsch. 56, 107-124
(1962)
- Serafini-Fracassini, A.; Stimson, W. H.: Studies on the Molecular Organi-
zation of the Proteoglycan of Bovine Nasal
Cartilage. In: Balazs 'Chemistry and Molecular
Biology of the Intercellular Matrix'. Academic
Press, London-New York 2, 887 (1970)
- Serafini-Fracassini, A.; Wells, P. J.; Smith, I. W.: Studies on the
Interaction between Glycosaminoglycans and Fibril-
lar Collagen. In: Balazs 'Chemistry and Molecular
Biology of the Intercellular Matrix'. Academic
Press, London-New York 2, 1201 (1970)
- Smith, J. W.; Frame, I.: Observations on the Collagen and Protein-Poly-
saccharid Complex of Rabbit Corneal Stroma.
J. Cell Sci. 4, 421-436 (1969)
- Toole, B. P.; Lowther, D. A.: The Effect of Chondroitinsulfate-Protein
on the Formation of Collagen Fibrils in vitro.
Biochem. J. 109, 857 (1968)
- Utesch, Ch.: Das elektronenmikroskopische Bild der Glykosaminoglykan Makro-
moleküle in einigen Geweben von Rattenembryonen,
dargestellt mit der Rutheniumrot- Methode.
Dissertation an der FU-Berlin 1972
- Vuust, J.; Pietz, K. A.: Biosynthesis of the α -Chains of Collagen Studied
by Pulse-Labeling in Culture. J. Biol. Chem. 245,
6201-6207 (1970)

Weiss, P.: Erzwingung elementarer Strukturverschiedenheiten am in vitro wachsenden Gewebe.

Arch. Entwickl. Mech. Org. 116, 438 (1929)

Abb. 1:

Epithel - Bindegewebsgrenze der embryonalen Maus Tag 16
Doppelt konturierte Basalmembran (B). Die Fibroblasten (F)
sind plump und besitzen kurze Zellfortsätze. Im ICR befinden
sich kleine Stapel kollagener Fibrillen (A).

Vergr. 1:21000



Abb. 3:

Coriumbereich der Maus Tag 2 pp

Beginnende Fibrillenbündelung (↑) mit deutlicher Quervernetzung durch PG. Im Fibroblasten prall geblähte endoplasmatische Zisternen (ER) mit granulärem und feinfilamentärem Inhalt.

Vergr. 1:70 000

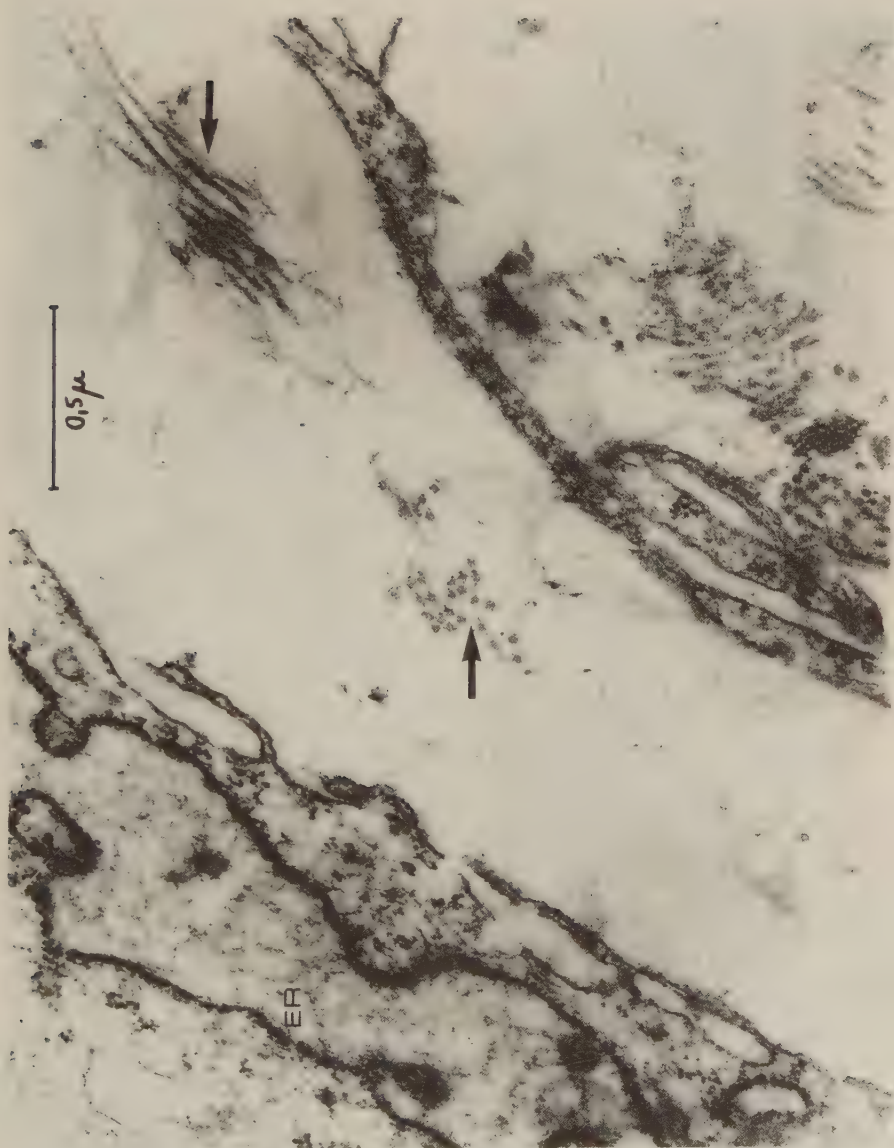


Abb. 4:

Coriumbereich der embryonalen Maus Tag 18

Dichte PG Strukturen (▲), die in Beziehung stehen
zu wachsenden kollagenen Bündeln (↑) und Fibroblasten-
ausläufern.

Vergr. 1:70 000

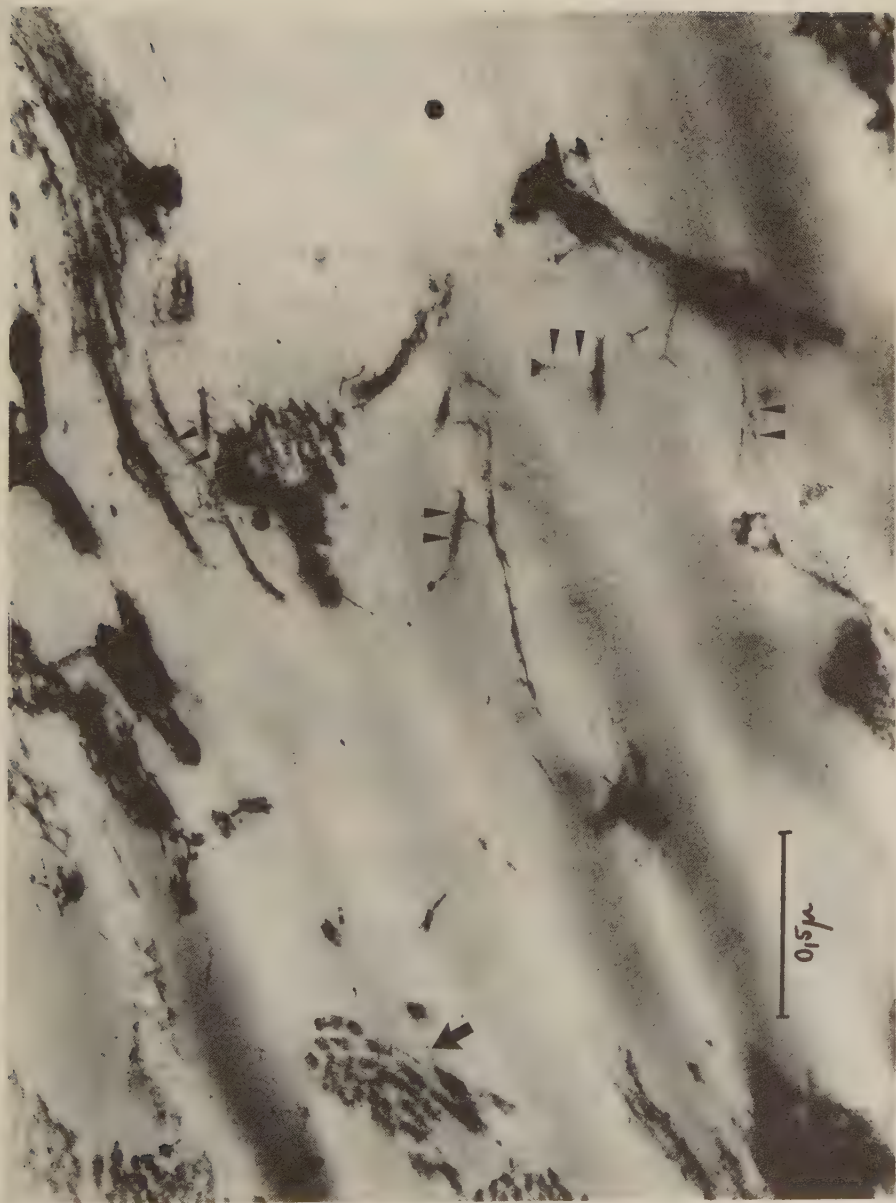


Abb. 5:

Coriumbereich der embryonalen Maus Tag 18

Zwischen wachsenden kollagenen Bündeln (↑) reichlich
PG Strukturen (▲), die zum Teil als Netz, zum Teil als
Granula mit feinen Filamenten (▲) imponieren.,

Vergr. 1:70 000

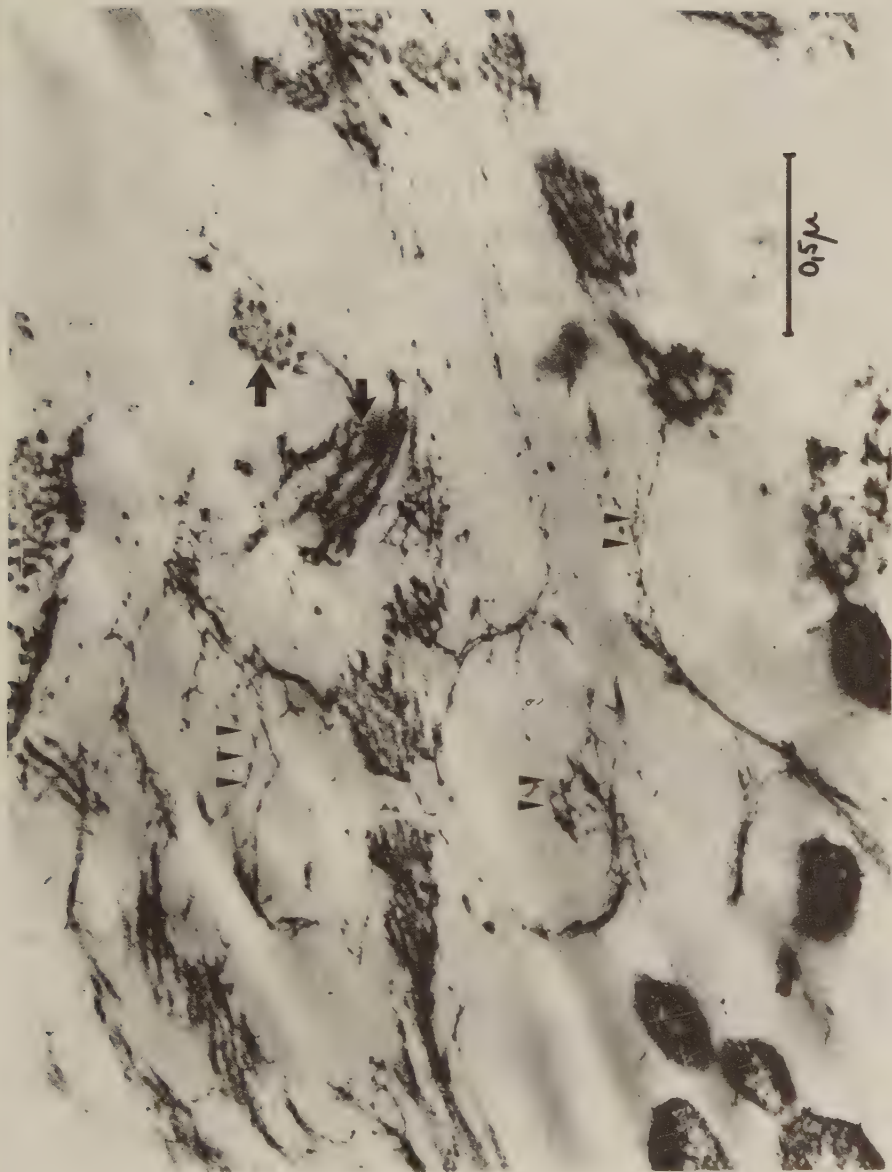


Abb. 6:

Coriumbereich der embryonalen Maus Tag 18

Zwischen zwei wachsenden kollagenen Bündeln liegt ein
dichtes PG Netz (↑).

Vergr. 1:70 000

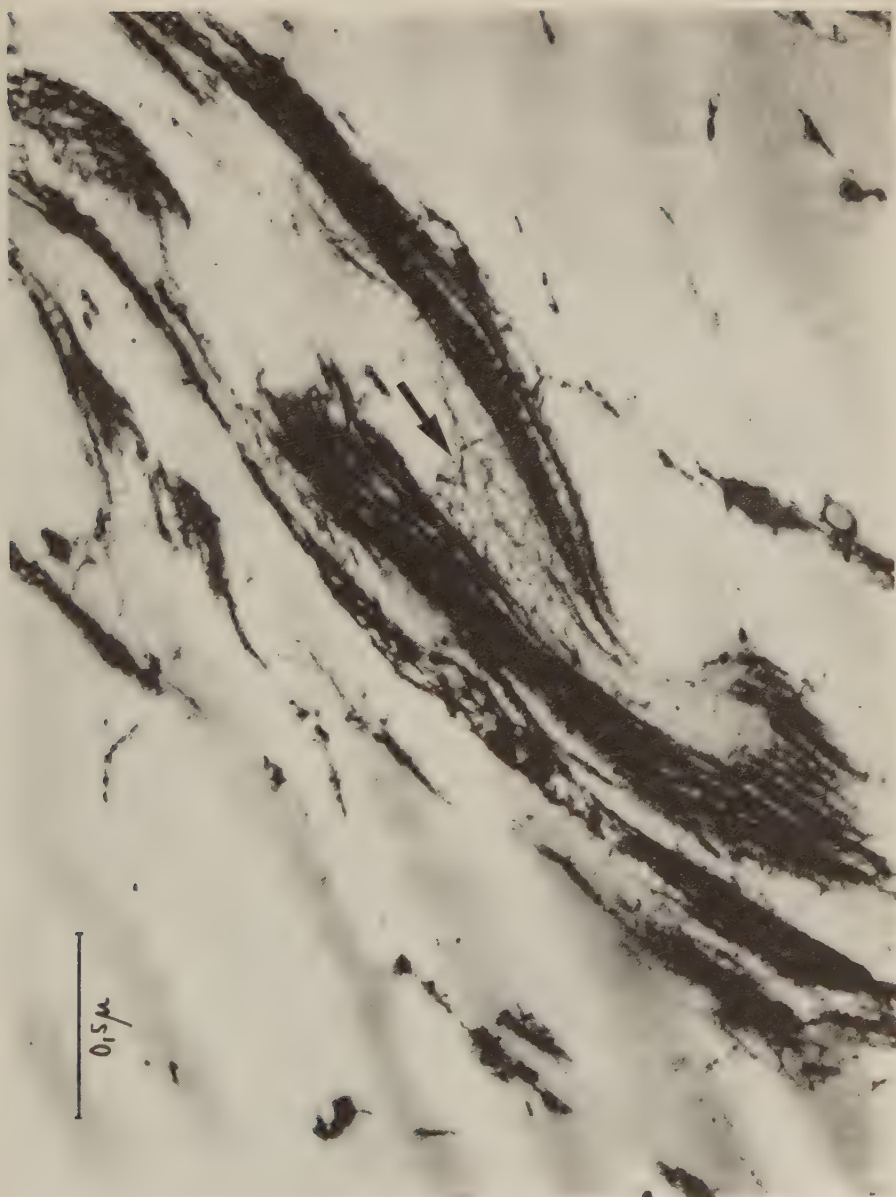


Abb. 7:

Coriumbereich der Maus Tag 6 pp

Kollagene Fibrillenbündel in mehreren Schnittebenen. Die Bündelung ist noch nicht abgeschlossen; die quergetroffenen Fibrillen haben unterschiedliche Abstände zueinander (↑), die längsgetroffenen laufen an ihren Enden fächerförmig auseinander (↗). Dazwischen reichlich PG Strukturen (▲), die zum Teil einen gestreckten Verlauf nehmen.

Vergr. 1:43700



Abb. 8:

Coriumbereich der Maus Tag 6 pp

Kollagene Fibrillen in unterschiedlichen Bündelungsstadien.
Deutliche Quervernetzung durch PG (▲). Netzartige PG
Strukturen (P).

Vergr. 1:57000



Abb. 9:

Coriumbereich der embryonalen Maus Tag 18

Kollagene Fibrillen in unterschiedlichen Bündelungsstadien. Zwischen den Fibrillen PG Strukturen (▲).

Vergr. 1:57000

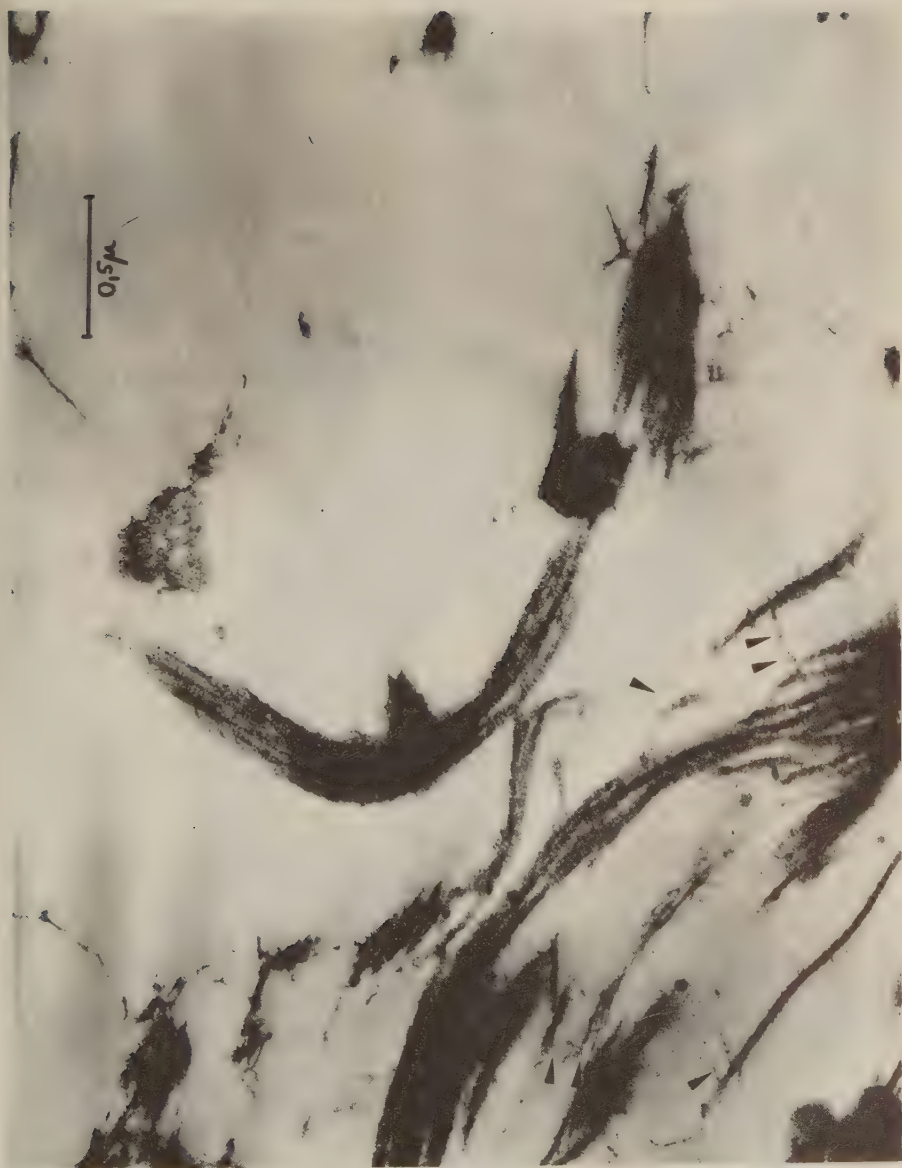


Abb. 10:

Coriumbereich der embryonalen Maus Tag 18

Kollagene Fibrillen in unterschiedlichen Bündelungsstadien. Die Quervernetzung der Fibrillen durch PG tritt deutlich hervor (▲). Feinfädige PG Strukturen (P).

Vergr. 1:57000

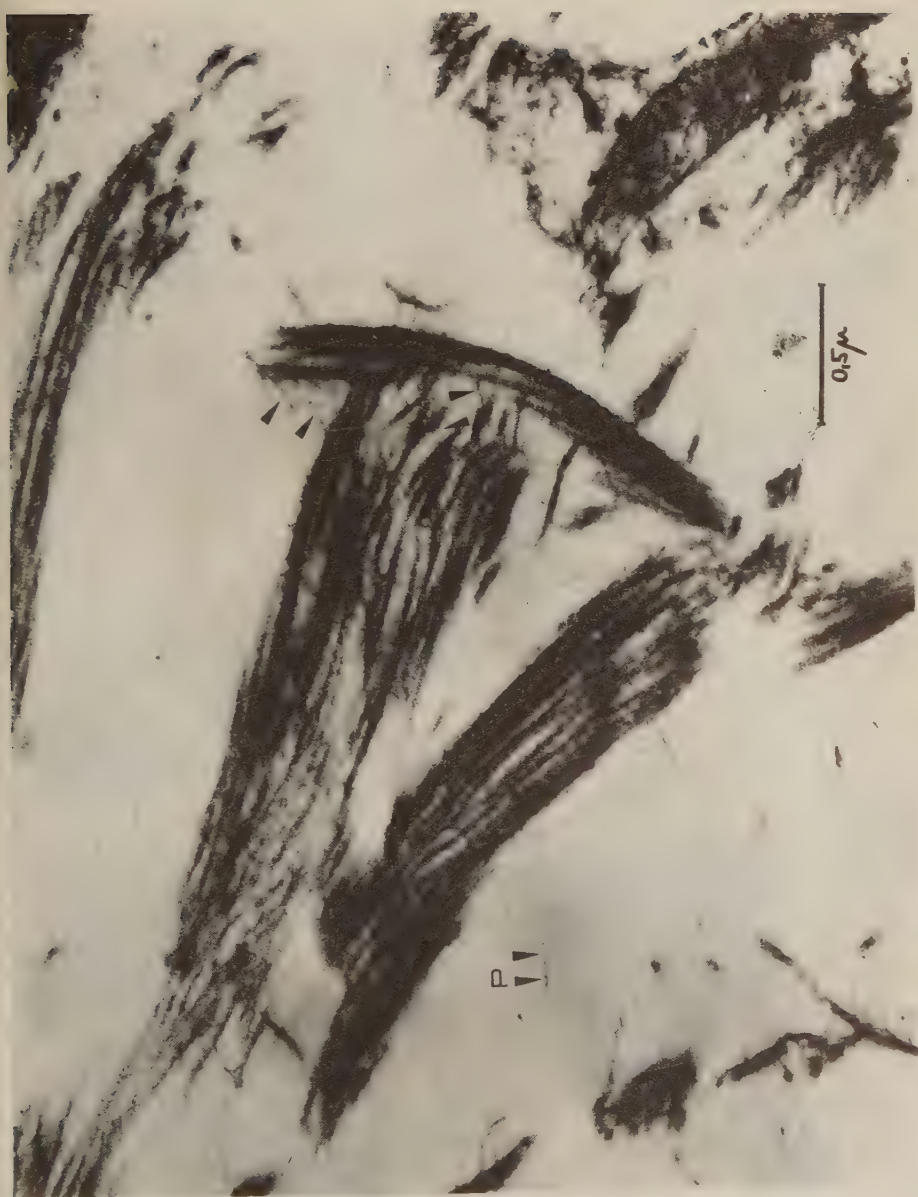


Abb. 11:

Coriumbereich der Maus Tag 2 pp

Fortgeschrittene Bündelung kollagener Fibrillen mit
deutlicher Quervernetzung durch PG (▲).

Vergr. 1:70 000

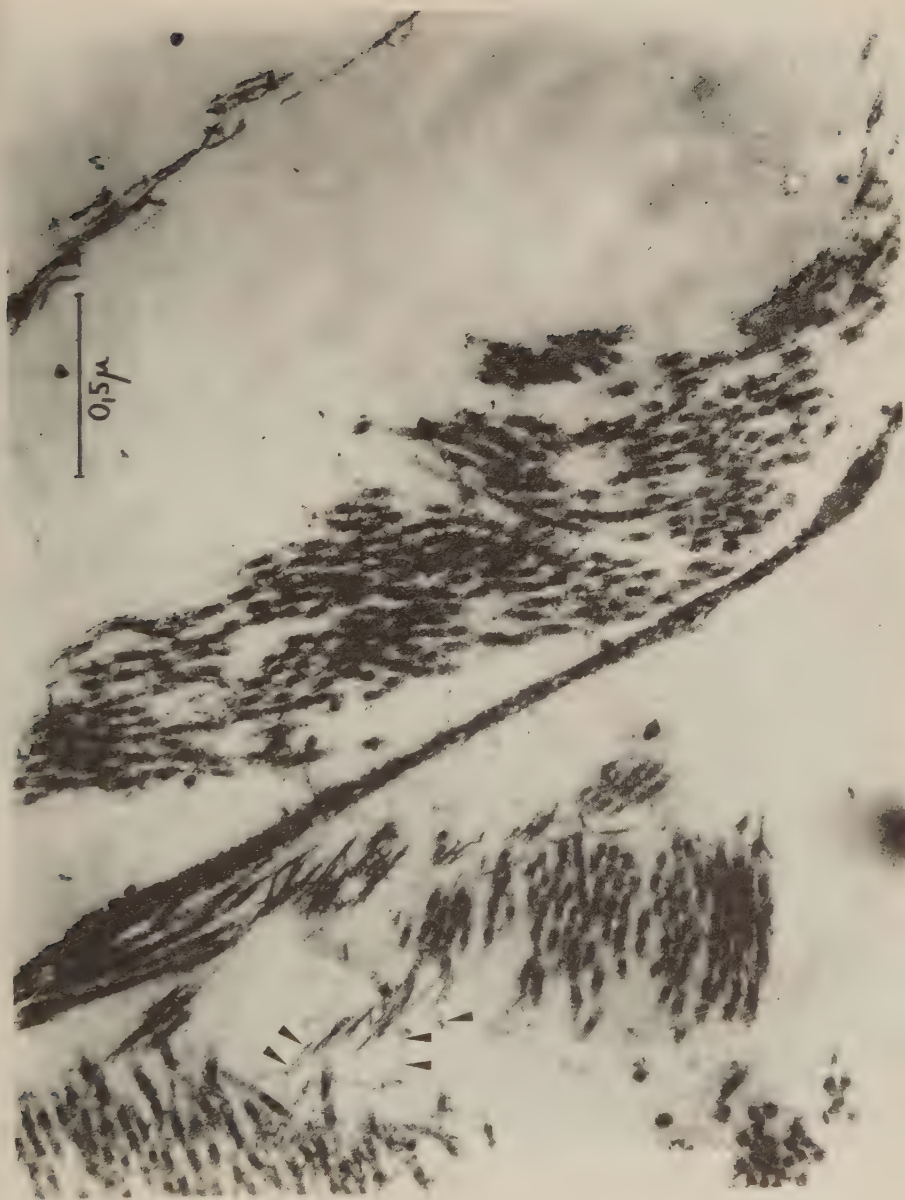


Abb. 12:

Epidermis und Corium der Maus Tag 6 pp

Reifes, mehrschichtig verhornendes Epithel (E), Keratohyalin granula (↙) im stratum granulosum, darunter das stratum basale mit septierten Interzellularräumen (↗). Regelmäßig wellenförmig Verlauf der zellulären und fibrillären Bestandteile des Corium (↑), Kapillare (K).

Vergr. 1:3500



Abb.13:

Epithel - Bindegewebsgrenze der Maus Tag 2 pp

Doppelt konturierte Basalmembran (B). Gestreckter Kern eines Fibroblasten (N_F), plumper Kern einer Epithelzelle (N_E). Im Interzellularraum des Corium reichlich kollagene Fibrillen (↑).

Vergr. 1:28000



Abb. 15:

Coriumbereich der Maus Tag 2 pp

Die Fibrillenbündel sind in mehreren Schnittebenen getroffen. Es liegen mehrere Stadien der Bündelung vor, sie ist zum Teil weit fortgeschritten (↑), zum Teil abgeschlossen (⬆). Die längs getroffenen Bündel sind größtenteils locker gepackt, sie verlaufen noch nicht parallel (↗) oder sind unterbrochen und besitzen noch keine Kontinuität (↖). Die Zellfortsätze sind schmal und lang ausgezogen. Ausgeprägtes Golgisystem (G). Im Interzellularraum Proteoglykanstrukturen (▲), hauptsächlich in Beziehung zu Kollagen- und Zellstrukturen.

Vergr. 1:35000



Abb. 16:

Coriumbereich der Maus Tag 2 pp

Weit fortgeschrittene Fibrillenbündelung. Die Fibrillen sind jedoch teilweise noch locker gepackt (↑). Die Quervernetzung der Fibrillen durch Proteoglykane ist deutlich (▲), sie erscheint stechapfelförmig. Im Interzellularraum sieht man polymorphe, homogen erscheinende Proteoglykanstrukturen.

Vergr. 1:70 000

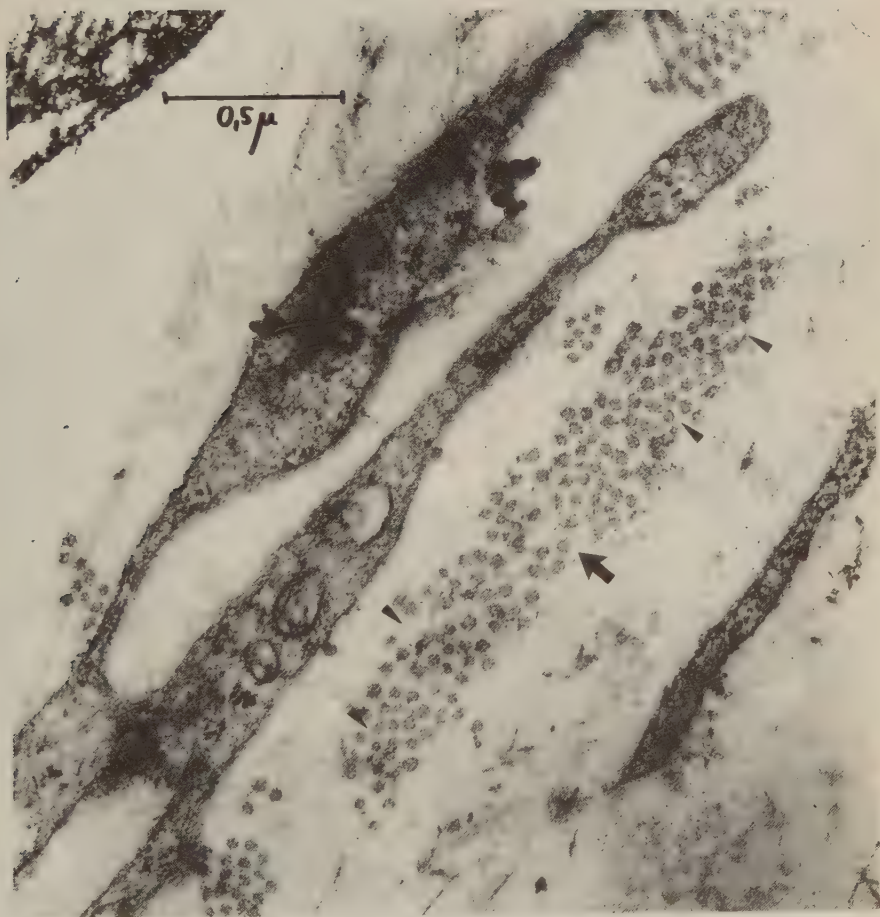
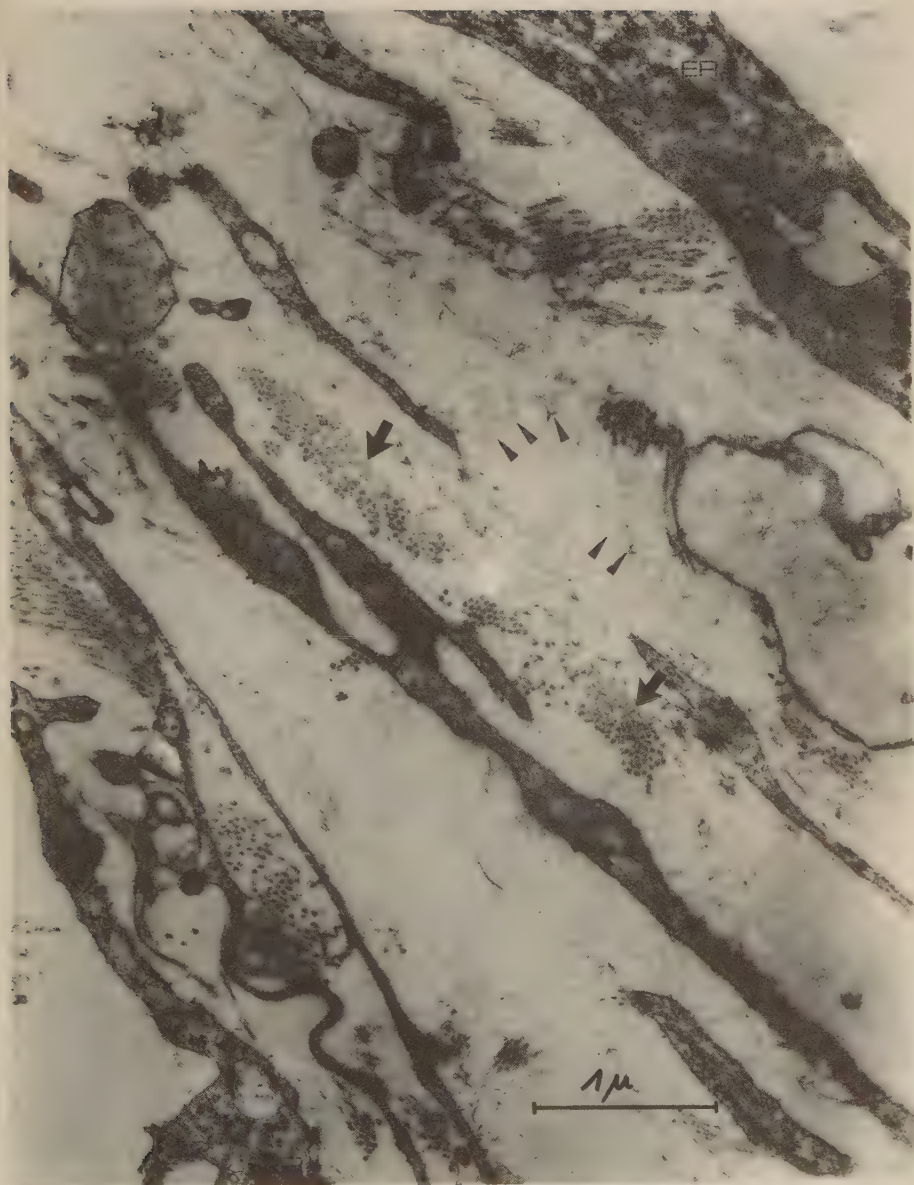


Abb. 17:

Coriumbereich der Maus Tag 2 pp

Hauptsächlich quergetroffene Fibrillenbündel zwischen sehr langen Zellfortsätzen. Die Bündelung ist weit fortgeschritten (↑), aber noch nicht abgeschlossen. Reichlich Proteoglykanstrukturen, die den Interzellularraum ausfüllen (▲). Endoplasmatisches Retikulum (rER).

Vergr. 1:35000



Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Merker danke ich herzlich
für die Überlassung des Dissertationsthemas und die
wertvolle Führung durch diese Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau U. Krüger, die mir
bei der schnittechnischen Präparation außerordentlich
hilfreich zur Seite stand.

LEBENS LAUF

Am 9. 6. 1948 wurde ich als Sohn des Facharztes Dr. med. Heinrich Taube und seiner Ehefrau Helga, geb. Hoogklimmer, in Berlin Schmargendorf geboren.

Nach vierjähriger Grundschulzeit wechselte ich 1958 auf das Humanistische-Gymnasium-Steglitz, an dem ich im Winter 1967/68 das Abitur bestand.

Im Sommersemester 1968 nahm ich mein Medizinstudium an der Freien Universität Berlin auf, der ich bis zum Staatsexamen am 4.2.1974 ununterbrochen angehört habe.

Meine Medizinalassistentenzeit verbrachte ich auf der Inneren Abteilung des Städt. Behring-Krankenhauses, der Chirurgischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Neukölln sowie in der Abteilung für Elektronenmikroskopie am I. Anatomischen Institut der FU Berlin. Meine Approbation als Arzt erhielt ich am 4.5.1975.

Im Anschluß an meine Medizinalassistentenzeit bewarb ich mich um eine wissenschaftliche Assistentenstelle am I. Anatomischen Institut der FU Berlin, die ich am 1.9.1975 antreten konnte. Wegen einer Sicherheitsüberprüfung arbeitete ich zwischenzeitlich als Assistenzarzt auf der Chirurgischen Abteilung des Elisabeth-Krankenhauses in Berlin Tiergarten.

Ich bin verheiratet mit Eveline Taube, geb. Schmidt, wir haben einen Sohn, Stephan Taube.

